UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1970 • Thèse n° 591

Recherches sur les Anthocyanogènes Oligomères de la Vigne et du Vin

Thèse pour le Doctorat de l'Université
(Mention Pharmacie)
présentée et soutenue publiquement
le Vendredi 16 Janvier 1970

par Philippe LACAZE
PHARMACIEN
Diplômé d'Études Spéciales d'Immunologie Générale et Appliquée
Diplômé National d'Œnologie
né le 7 Juin 1942 à COZES (Charente-Maritime)

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

MM J. MASQUELIER, Professeur . . . . . Président
E. NEUZIL, Professeur . . . . . } Juges
J.C. COLLETER, Professeur . . . . . } Juges
R. BAUTE, Agrégé . . . . . } Juges

Éditions Bergeret, 2, rue Bergeret - BORDEAUX
— Tél: 91-12-59 —

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543911_0016

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1970 • Thèse n° 591

Recherches sur les Anthocyanogènes Oligomères de la Vigne et du Vin

Thèse pour le Doctorat de l'Université
(Mention Pharmacie)
présentée et soutenue publiquement
le Vendredi 16 Janvier 1970

par Philippe LACAZE
PHARMACIEN
Diplômé d'Études Spéciales d'Immunologie Générale et Appliquée
Diplômé National d'Œnologie
né le 7 Juin 1942 à COZES (Charente-Maritime)

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

MM **J. MASQUELIER,** Professeur . . . . . **Président**
E. NEUZIL, Professeur . . . . . } **Juges**
J.C. COLLETER, Professeur . . . . . }
R. BAUTE, Agrégé . . . . . }

Éditions Bergeret, 2, rue Bergeret - BORDEAUX
— Tél: 91-12-59 —

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

AVANT - PROPOS

Il nous est difficile d'exprimer nos remerciements à Monsieur le Professeur MASQUELIER, Assesseur du Doyen, Directeur de l'Unité d'Enseignement et de Recherche de Pharmacie. Nous voudrions le faire simplement. Il nous a toujours accueilli avec sollicitude et bonté et nous a fait profiter de son immense culture.
Qu'il trouve ici l'expression de notre gratitude et de notre profond attachement.

A Monsieur le Professeur NEUZIL qui nous fait l'honneur de siéger dans notre jury de thèse. Nous lui exprimons notre respectueuse reconnaissance.

Monsieur le Professeur COLLETER a aimablement accepté de juger ce travail. La qualité de l'enseignement qu'il nous a dispensé nous rend plus sensible à l'honneur qu'il nous fait. Nous le prions de trouver ici l'expression de nos respectueux sentiments.

A Monsieur le Professeur agrégé BAUTE qui nous a toujours accordé sa sollicitude bienveillante. Respectueux remerciements.

A Monsieur le Professeur agrégé GADRET, qui a relu notre thèse. Sincère merci.

Ce travail doit énormément à Monsieur MICHAUD, chef de travaux au laboratoire de Matière Médicale. Nous avons sans cesse fait appel à lui et c'est toujours avec la même compétence, amabilité et compréhension qu'il nous a répondu. Nous le prions de croire à notre profonde gratitude et à notre très respectueux attachement.

A tous les membres du laboratoire de Matière Médicale qui nous ont manifesté leur amitié.

En particulier à Mlle LESCA qui a contribué à nos travaux, à Mlle ROUDGE et Mlle TRIAUD, avec nos remerciements amicaux.

*

Ces recherches ont bénéficié de l'aide généreuse et efficace du Comité Interprofessionnel des Vins de Bordeaux auquel nous adressons l'expression de notre bien vive reconnaissance.

*

RECHERCHES SUR LES ANTHOCYANOGENES OLIGOMERES

DE LA VIGNE ET DU VIN

CHAPITRE I
INTRODUCTION

°°°

Sur bien des points, l'étude des propriétés biologiques du vin reste à faire . La diversité et la complexité des molécules qui le constituent ne facilitent pas la tâche du biologiste . Et c'est pourquoi ce chapitre de l'œnologie garde encore une part d'inconnu .

C'est ainsi que le terme de "tanin" qui englobe, en fait, une réalité technologique, recouvre une certaine incertitude sur la nature, le devenir, et l'activité sur l'organisme humain, de ses molécules élémentaires.

La mise en évidence du leucocyanidol dans le vin (MASQUELIER, 59) fut le premier jalon sur le long et difficile chemin, d'une connaissance plus approfondie de ces substances . Cette découverte obligeait à "reconsidérer complètement tous les problèmes du vin qui sont en rapport avec la présence des tanins"(77) .

On savait déjà que ce composé est une des molécules de base de l'édifice des tanins . Cela seul justifie déjà son étude dans le vin . Car, en effet, son importance technologique est loin d'être négligeable . Par ses propriétés organoleptiques, son astringence en particulier, il est responsable d'une partie du goût . En outre, il semble avoir un rôle décisif dans la coloration des vins vieux .

Mais il est également doué d'une grande activité biologique . En plus de ses propriétés bactéricides, il est un facteur vitaminique P parmi les plus puissants connus à ce jour . Par sa présence dans le vin, celui-ci représente dans l'alimentation un apport naturel et non négligeable de cette vitamine .

Or une meilleure connaissance des propriétés physiques et chimiques du leucocyanidol monomère de synthèse a montré que cette molécule est particulièrement instable : elle tend à se condenser, avec une grande facilité, en polymères qui ne présentent plus d'activité biologique .

On se heurte alors au paradoxe d'une molécule instable qui, se trouvant dans un milieu soumis d'abord à des transformations aussi profondes que celles de la fermentation, persiste ensuite dans un liquide aussi fragile que le vin . Or la preuve a bien été faite que le vin contient des fractions leucoanthocyaniques peu condensées (57) , actives comme facteur vitaminique P (52).

Devant ces incertitudes, il nous a paru intéressant de tenter, avec les moyens qu'offre la chromatographie, de résoudre le problème de la conservation des formes peu condensées du leucocyanidol dans le vin . Il s'agit d'une étude qualitative, notre but étant avant tout de connaître la nature des substances sous lesquelles se dissimule la fraction leucoanthocyanique et à l'abri desquelles se conserve son potentiel d'activité biologique .

CHAPITRE II
GENERALITES SUR LES TANINS

°°°

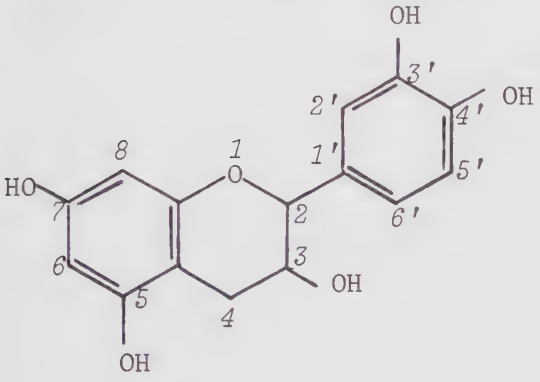
A - PROPRIETES GENERALES

1°- Définition

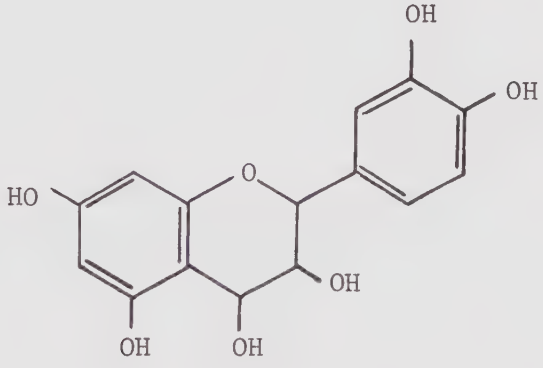
La dénomination, couramment employée, de "tanin" , ne recouvre pas une entité définie . Elle est fondée sur une opération industrielle : le tannage, c'est-à-dire la transformation de la peau fraîche en cuir imputrescible . Est dite "tanin" toute substance qui possède cette propriété . On sait maintenant que plusieurs groupes de produits de nature bien différente, constituent l'ensemble des substances désignées sous le nom générique de tanin. Ce sont tous ceux capables de se combiner aux protéines de la peau . Bien que cette propriété chimique apporte déjà plus de précision, et qu'elle permette en outre de comprendre pourquoi ces substances sont astringentes (3), par action sur les protéines des papilles de la langue, elle est cependant insuffisante .

Chimiquement ce sont des polyphénols . Une première division, à l'intérieur de ce groupe hétérogène, permet de distinguer les tanins catéchiques ou condensés, des tanins galliques, ou hydrolysables . Ces derniers sont ainsi appelés, parce qu'ils sont facilement hydrolysés par voie chimique ou enzymatique . Ces tanins galliques , sont sinon absents, tout au plus à l'état de traces dans les vins (80), et il existe une forte présomption que leur origine soit exogène .

En revanche, le groupe des tanins catéchiques doit être considéré comme un des constituants les plus importants du vin . Leur nom vient de ce que parmi les molécules élémentaires qui les constituent, on trouve la (+)-catéchine ou tétrahydroxy-5, 7, 3', 4' flavanol-3. (I)



I - Catéchine



II - Leucocyanidol

La connaissance de ce groupe fit un pas décisif lorsque l'on décela dans les vins blancs d'abord, (MASQUELIER , 59), puis dans les vins rouges (78) , une molécule qui semble être l'unité élémentaire dont la condensation en édifices plus ou moins importants conduit, associée cependant avec d'autres polyphénols, à toutes les substances dont l'ensemble constitue finalement les tanins catéchiques : il s'agit du Leucocyanidol ou tétrahydroxy-5, 7, 3', 4' flavanediol-3, 4 . (II) .

On peut donc concevoir les tanins catéchiques comme l'ensemble des substances qui résultent de la polymérisation plus ou moins élevée des flavanes, à savoir les leucoanthocyanes et les catéchines . A l'inverse , avec BATE-SMITH (2) on doit considérer les leucoanthocyanes comme les précurseurs les plus importants des tanins .

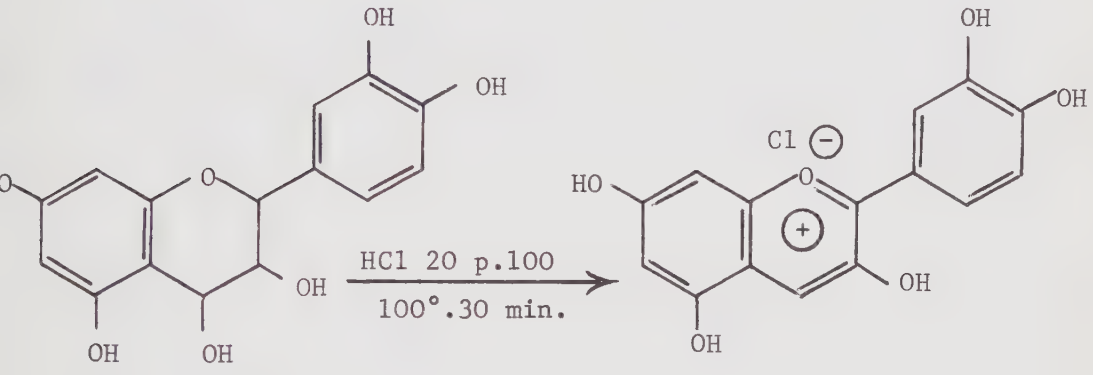
La diversité des propriétés des tanins résulte de la pluralité de leur degré de condensation . Les molécules monomères, leucocyanidol et (+)-catéchine par exemple, sont solubles dans l'eau, mais ce ne sont pas de véritables "tanins" . Elles acquièrent cette propriété par condensation en grosses molécules, encore solubles, mais qui ont une taille suffisante pour se combiner aux protéines : ce sont alors de véritables "tanins" . Au-delà, la polymérisation transforme ces substances en produits insolubles dans l'eau : ce sont les phlobaphènes . Nous verrons plus loin que certaines propriétés physiologiques de ces substances, varient dans le sens inverse : aux molécules monomères correspond la plus grande activité, les polymères étant inactifs .

Pour mieux comprendre ces particularités, nous devons maintenant considérer les propriétés comparées des molécules élémentaires .Nous ne rappellerons ici que les notions qui sont indispensables pour éclairer notre sujet .

2°- Propriétés chimiques

Les propriétés chimiques des leucoanthocyanes et des catéchines sont très voisines . Cela se comprend aisément si l'on note que ces deux molécules ne diffèrent entre elles que par la présence sur le C_4 du leucocyanidol d'un groupe hydroxyle (OH), absent dans la (+)-catéchine . Il existe cependant une réaction caractéristique permettant de les différencier .

Les leucoanthocyanes possèdent la propriété de se transformer en pigments anthocyaniques par chauffage en milieu acide . Il se produit une intense coloration rouge qui correspond à la formation d'un cation flavylium (III) . Ainsi, par exemple, le leucocyanidol conduit au cyanidol . C'est à cette propriété qu'ils doivent leur nom .



II *III*

Il faut noter que cette dénomination semble relier directement ces composés à des formes incolores des anthocyanes . BATE-SMITH (2) souligne qu'il y a là une anomalie :

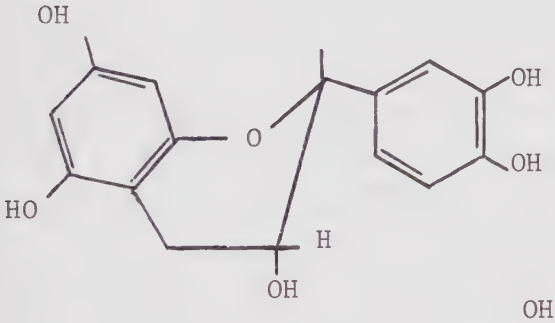
" Il est regrettable, écrit-il, que la coloration produite au cours du chauffage avec l'acide chlorhydrique ait attiré l'attention sur la parenté unissant les leucoanthocyanes aux anthocyanes, parenté qui, du point de vue physiologie végétale, peut être considérée comme tout à fait fortuite " .

Certains auteurs avaient, en effet, pensé voir dans les leucoanthocyanes les précurseurs des anthocyanes (3, 32) selon un mécanisme enzymatique (41) . Mais cette opinion ne semble pas devoir être retenue (8) .

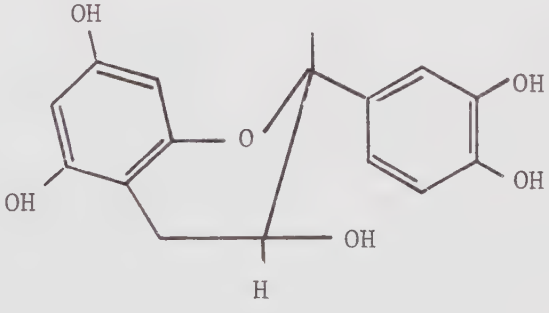
Les catéchines, en revanche, dans les mêmes conditions, c'est-à-dire à chaud et en milieu acide, ne fournissent pas de coloration rouge comme les leucoanthocyanes mais conduisent à des précipités bruns formés de hauts polymères .

3°- Structure .

Les catéchines sont des flavanols-3 . En plus des deux noyaux latéraux phénoliques, elles comprennent un noyau pyranique dont la saturation crée une déformation de ce cycle dans l'espace . On lui attribue généralement la conformation en "demi-chaise" (IV, V) : la molécule n'est pas plane et possède deux centres d'asymétrie en C_2 et en C_3. D'où l'existence de stéréoisomères (97).



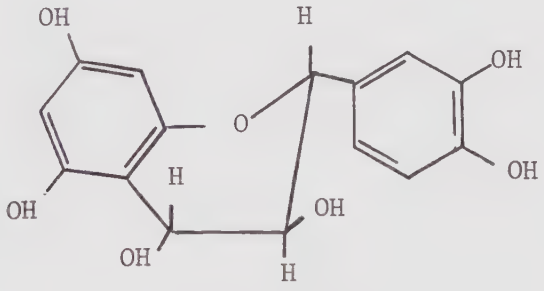
IV . (+) - Catéchine



V. (-) - Epicatéchine

Sont dits appartenir à la série (+) ceux qui possèdent l'hydroxyle du carbone 3 en position équatoriale et à la série (-) ceux qui possèdent ce même hydroxyle en position axiale . D'autre part, on décrit habituellement comme dérivés de la catéchine (IV), les molécules possédant une configuration cis pour ces mêmes carbones .

Avec l'introduction d'un nouvel hydroxyle sur C_4 , la situation stéréochimique de la molécule de leucocyanidol se complique encore . On commence seulement à entrevoir la configuration des produits synthétiques . Selon MICHAUD (65) le composé principal du leucocyanidol de synthèse obtenu par réduction du taxifoliol (voir plus loin : Chapitre II, D) pourrait être le racémique de la configuration trans-2, 3 trans-3, 4 (VI).

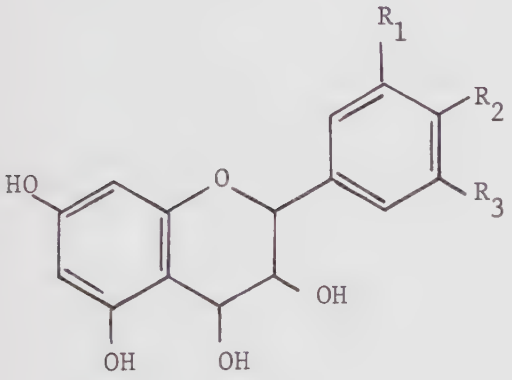


VI - Leucocyanidol

(2R 3S 4S -tétrahydroxy-5,7,3',4' flavanediol-3,4)

En l'absence de données chromatographiques complètes, il est encore plus difficile de se faire une idée exacte de la stéréoisomérie des composés naturels . Cette connaissance serait cependant utile pour l'identification des très nombreuses taches qui compliquent singulièrement l'interprétation des chromatogrammes de ces composés .

Nous avons jusqu'à présent mentionné seulement les dérivés polyhydroxylés en 5, 7, 3', 4' . Ce sont les plus fréquemment rencontrés à l'état naturel . A ce groupe appartiennent les catéchines et le leucocyanidol . Il ne faut pas oublier cependant d'autres dérivés qui ont été isolés eux aussi des végétaux . On peut distinguer ceux dont le premier cycle comporte une double hydroxylation en C_5 et C_7 : ce sont donc des dérivés du Phloroglucinol; et ceux dont la répartition des hydroxyles phénoliques est différente . Mais ces derniers n'ont pas été rencontrés dans la vigne et le vin . En conséquence nous ne donnons que quelques exemples du premier groupe (VII) .



VII

Leucopélargonidol :

$R_1 = R_3 = H$

$R_2 = OH$

Leucocyanidol :

$R_1 = R_2 = OH$

$R_3 = H$

Leucodelphinidol :

$R_1 = R_2 = R_3 = OH$

Seuls les dérivés du leucocyanidol ont pu, à ce jour, être caractérisés dans le vin . Toutefois il faut signaler que le leucodelphinidol a été caractérisé dans la pulpe, et la pellicule du raisin ainsi que dans les feuilles de la vigne (13) .

4°- Autres propriétés .

Solubilité :

Les leucoanthocyanes aussi bien que les catéchines sont solubles dans l'eau . Leur solubilité décroît avec leur degré de polymérisation comme nous l'avons déjà dit, pour aboutir à des composés de poids moléculaires très élevés, complètement insolubles, que l'on désigne habituellement sous le nom de phlobaphènes .

Quel que soit leur degré de polymérisation, ces produits sont généralement solubles dans les alcools (méthylique, éthylique, propylique, isopropylique) ainsi que dans l'acétone et l'acétate d'éthyle . Ce dernier les extrait plus ou moins bien de leurs solutions aqueuses . Cette propriété permettra de les faire passer plus ou moins facilement de leur solution aqueuse dans une phase de solvant organique plus facile à traiter ultérieurement et surtout offrant la possibilité d'être déshydratée .

Ils sont insolubles ou peu solubles dans l'éther de pétrole, l'hexane, le chloroforme, le benzène. On peut ainsi les précipiter de leurs solutions organiques avec lesquelles ces solvants sont miscibles en toute proportion. C'est un des principes de leur séparation (voir plus loin Chapitre III - E) .

Propriétés spectrophotométriques :

Généralement incolores- une coloration indiquerait la présence d'une impureté d'oxydation ou de polymérisation - ces corps absorbent fortement la lumière ultraviolette à 280 nm, en solution dans l'éthanol (38). Cette propriété n'est intéressante que pour des produits purs car elle permet ainsi leur dosage . Son absence de spécificité lui interdit cependant de servir à la caractérisation des produits en mélange .

Etat naturel :

Les leucoanthocyanes et les catéchines monomères existent-ils à l'état naturel ? Si la réponse positive à cette question ne fait aucun doute en ce qui concerne les catéchines, puisque la catéchine et l'épicatéchine ont été isolées de nombreux végétaux, il n'en va pas de même pour les leucoanthocyanes . Une étude attentive des propriétés de ces composés fait apparaître une contradiction. D'un côté les propriétés vitaminiques P sont le fait des petites molécules . Les végétaux, dont les leucoanthocyanes sont les sources de vitamine P et dont les propriétés physiologiques sont bien établies, doivent donc logiquement contenir des molécules peu condensées . D'un autre côté, il n'existe encore aucune preuve dûment établie montrant l'existence chez le végétal de leucoanthocyane monomère . En revanche on trouve de nombreux polymères plus ou moins condensés . Comment concilier ces deux faits apparemment opposés ?

En outre, beaucoup plus que les catéchines, les leucoanthocyanes ont une tendance particulière à se polymériser . Grâce au leucocyanidol monomère de synthèse, on a pu se rendre compte de la très grande instabilité à l'air, aux acides et à la lumière . Si donc le monomère existe éventuellement à l'état naturel, comment pourrait-il se conserver en cet état dans les produits d'extraction ?

Le présent travail se propose de tenter de répondre à ces questions, tout au moins en ce qui concerne le vin . Auparavant il est utile de préciser les propriétés relatives à chaque degré de condensation . On pourrait donc choisir, pour cet exposé, la voie rationnelle, du simple au complexe, du monomère aux polymères . Nous préférons prendre le chemin inverse et aller des polymères aux oligomères en passant par le monomère . Ceci correspond mieux à l'ordre chronologique suivant lequel a été menée l'étude de ces substances depuis quelques dizaines d'années .

B - LES POLYMERES

Les premiers tanins isolés étaient donc des polymères, soit parce qu'ils étaient sous cette forme dans les végétaux, soit parce qu'une technologie défectueuse modifiait sensiblement, au cours de l'extraction, la nature des polyphénols originels . Il en fut ainsi pour le vin . Le terme d' "œnotanin" désignait l'ensemble des polyphénols du vin, encore appelé "matière tannoïde" , "matières colorantes", termes dont l'imprécision est révélatrice de l'absence de connaissances chimiques précises .

Ces "tanins" polymérisés sont des molécules complexes dont le poids moléculaire est supérieur à 1200-1500 mais inférieur à 3000-4000 . En deçà, on est en présence des polyphénols simples, ou oligomères . Au-delà, les molécules, devenant insolubles, perdent leur pouvoir tannant : ce sont les phlobaphènes .

Tous les produits, quel que soit leur degré de condensation, qui fournissent par action des acides et de la chaleur des anthocyanidols colorés en rouge, avec d'ailleurs des rendements variables, seront appelés anthocyanogènes .

En outre, la dégradation acide ménagée montre parfois, à côté de la structure de base, le leucocyanidol (II), qui est responsable de la formation de l'anthocyanidol, la présence d'autres flavanes tels que les catéchines .

Ainsi, en étudiant les produits de la dégradation ménagée des anthocyanogènes, on note que deux cas peuvent se produire . Dans les produits libérés par les acides faibles on peut trouver :

a) soit exclusivement des composés dérivés de leucoanthocyanes

b) soit ces mêmes composés accompagnés de catéchines .

Il existe donc des polymères leucoanthocyaniques purs et des copolymères leucoanthocyane-catéchine.

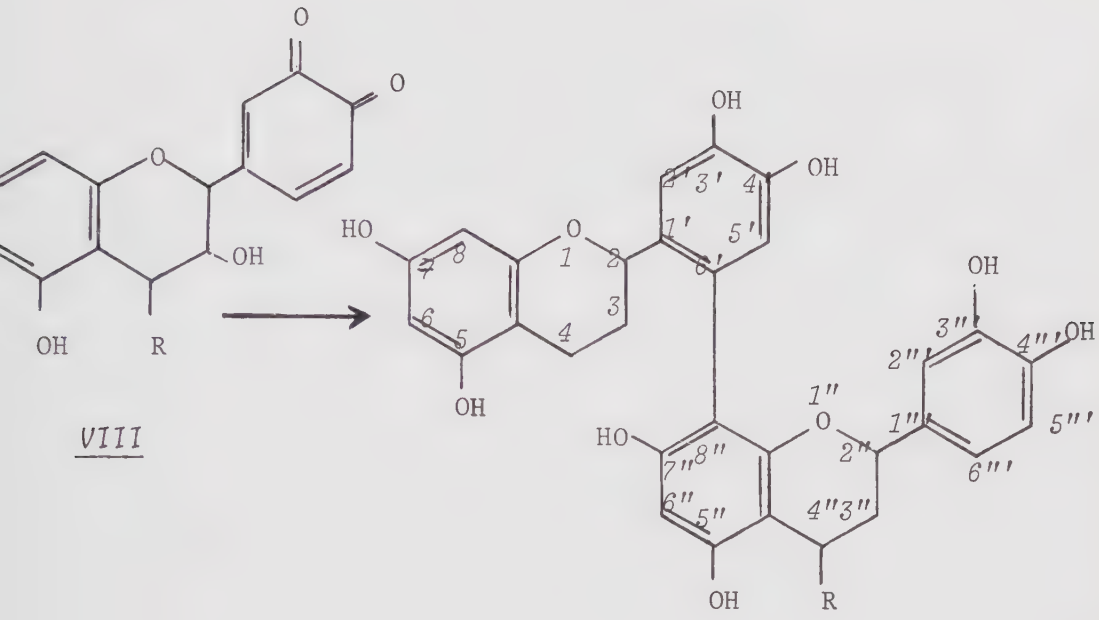
On a tenté, par de nombreux travaux, de comprendre comment ces molécules peuvent se polymériser . A l'heure actuelle il faut considérer les résultats de ces recherches comme des hypothèses dont la probabilité s'accroît . En fait la complexité de cette polymérisation est telle qu'il s'agit non pas d'un phénomène unique, dont on pourrait dégager des lois simples, mais d'au moins deux processus, simultanés ou successifs .

1°- Polymérisation oxydative et enzymatique .

Selon HATHWAY (29, 30, 31) la polymérisation doit faire intervenir une étape d'oxydation, avec ou sans intervention d'enzymes (polyphénoloxydase) .

On voit alors apparaître une structure o-quinonique (VIII) .

.....

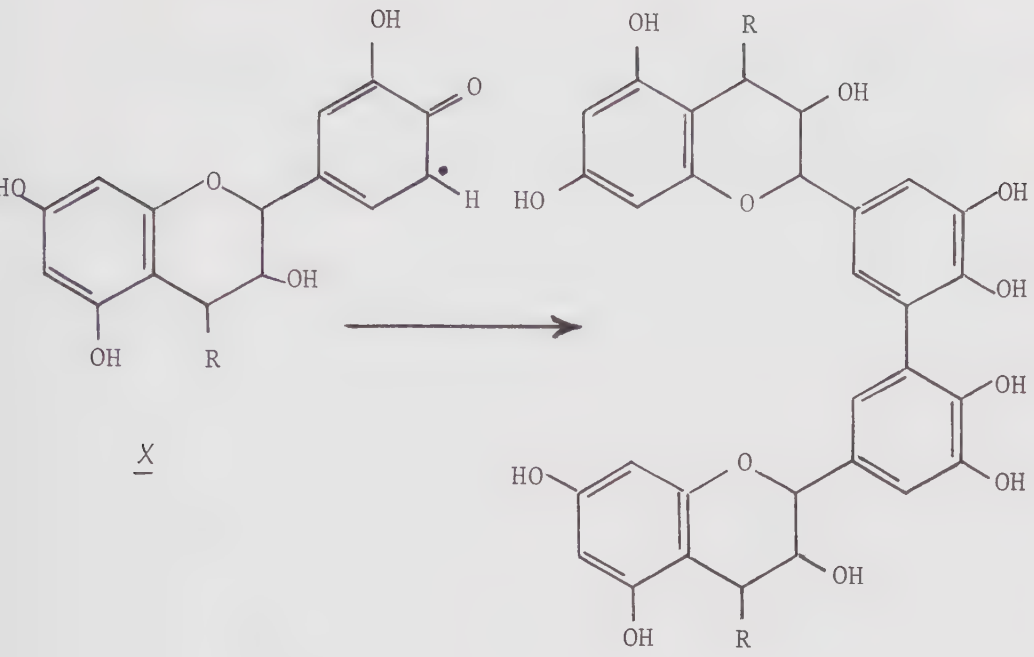


VIII

IX

La liaison a lieu entre $C_{6'}$ et $C_{8''}$ (ou $C_{6''}$). Elle peut se faire indifféremment entre le leucocyanidol (R=OH) ou la catéchine (R=H) et donner ainsi naissance soit à des polymères soit à des copolymères. On notera que dans ces conditions la liaison se fait en méta des deux hydroxyles o-diphénoliques. Bien entendu, le dimère comporte toujours des groupes o-diphénoliques, capables de s'oxyder à leur tour et de permettre à la polymérisation de se poursuivre.

Il est possible d'envisager un autre processus d'oxydation qui conduit à des liaisons différentes de celles obtenues par l'intermédiaire de la structure quinonique. Dans le cas d'oxydation couplée entre deux molécules de polyphénols, on peut voir apparaître un radical libre (X).



X

XI

Dans la molécule XI, la liaison s'est faite par $C_{5'}$-$C_{5'''}$. On peut également envisager des liaisons $C_{5'}$-C_8 ou C_8-$C_{8''}$. On remarquera que, contrairement à ce qui se passe lorsqu'il y a formation de quinone, la liaison a lieu en ortho par rapport au groupe o- diphénolique.

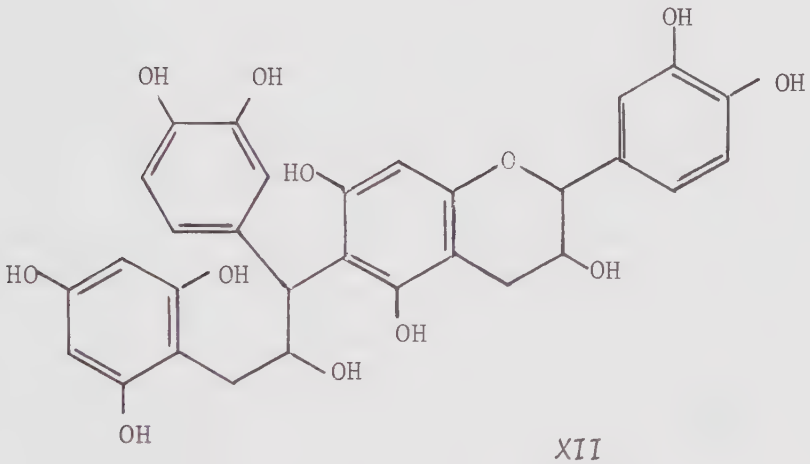
2°- Polymérisation catalysée par les acides.

Lorsque l'on acidifie une solution de leucocyanidol monomère, on note la formation plus ou moins rapide suivant les concentrations réciproques, d'un louche puis

d'un précipité . Le produit formé est un polymère comme il est facile de le vérifier par chromatographie sur papier.

Il était logique de penser que cette forme de polymérisation pouvait intervenir dans des milieux naturels de pH acide faible comme le vin (18, 85, 86, 87) .

Pour les catéchines FREUDENBERG (17) a décrit le mécanisme de cette condensation, qui entraîne une ouverture du cycle pyranique d'une des molécules(XII).

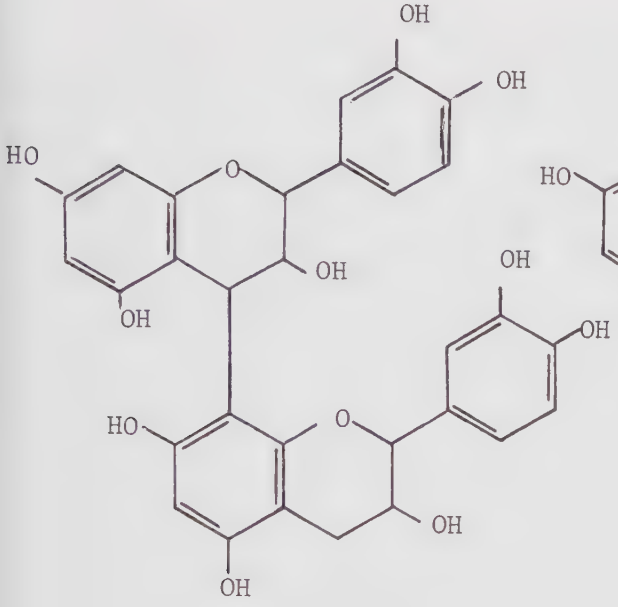


XII

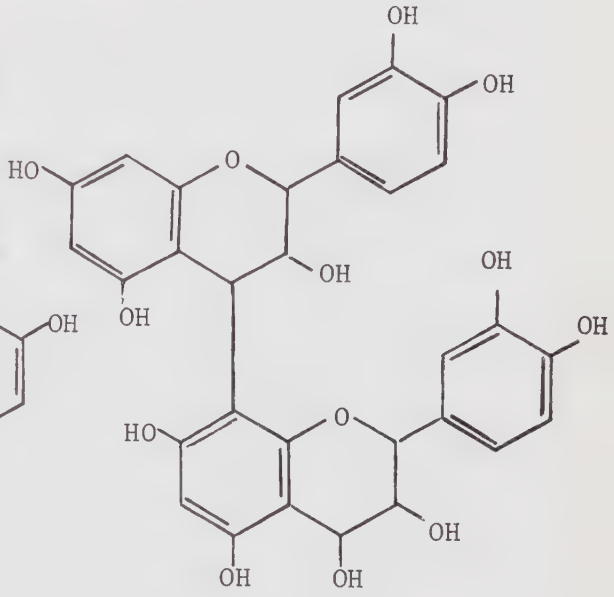
En ce qui concerne les flavanediols-3-4, on connaît moins bien les étapes de la condensation acide, malgré sa facile obtention . Des hypothèses ont été avancées par FREUDENBERG (19) , selon lesquelles la liaison aurait lieu entre C_4 et $C_{8'}$ (ou $C_{6'}$) .

Il est relativement aisé d'obtenir le produit de condensation entre le leucocyanidol de synthèse et la (+)- catéchine, en milieu acide (11). Vraisemblablement la structure XIII peut lui être attribuée .

D'une manière analogue il est possible de représenter la condensation de deux molécules de leucocyanidol (XIV) .



XIII



XIV

Dans ce cas, toutefois, la nouvelle molécule possède à la fois le site actif en C_8 (ou C_6) et l'hydroxyle nécessaire à la réaction en C_4 . Il y aura donc possibilité de polymérisation en chaîne .

Que ce soit selon l'une ou l'autre modalité , polymérisation oxydative ou polymérisation catalysée par les acides, on voit donc que la condensation du leucocyanidol peut se poursuivre d'une manière presque indéfinie et qu'elle conduit ainsi à de hauts polymères, d'abord tanins puis phlobaphènes . Rien n'empêche d'ailleurs que ces deux processus soient simultanés .

C - LE LEUCOCYANIDOL MONOMERE

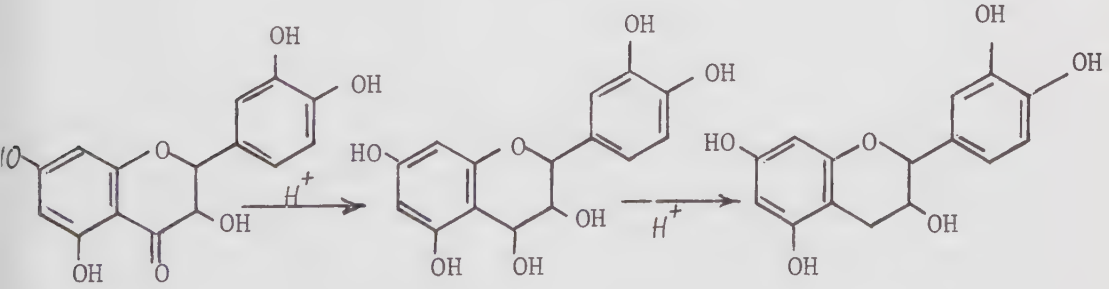
L'étude de la structure des produits hautement condensés ne pouvait progresser que parallèlement à la connaissance des molécules élémentaires .

La catéchine a perdu tout mystère depuis longtemps, car elle a pu être préparée à partir de nombreux végétaux . Il n'en va pas de même pour le leucocyanidol puisque la question se pose encore de savoir s'il existe à l'état monomère dans la nature .

En outre, l'interprétation des chromatogrammes, pour y déceler le leucocyanidol monomère, était délicate en l'absence d'un témoin monomère authentique . Dès lors l'intérêt d'une synthèse chimique devenait évident (27) .

1° - Synthèse

La synthèse du leucocyanidol fut décrite pour la première fois par SWAIN (92) . La réduction du taxifoliol (XV) par le borohydrure de sodium conduisait au leucocyanidol, mais le produit n'avait pu être obtenu à l'état cristallisé .



Taxifoliol (XV) *Leucocyanidol (II)* *Catéchine (I)*

D'autres auteurs ont également obtenu des dérivés du leucocyanidol par des voies indirectes en partant de dérivés du taxifoliol .

MICHAUD et MASQUELIER (66) viennent de réaliser cette synthèse et d'obtenir le leucocyanidol monomère et cristallisé par réduction directe du dihydroquercétol (XV) .

L'existence d'une liaison hydrogène entre le carbonyle en 4 et l'hydroxyle du carbone 5 nécessite l'emploi de réducteur assez énergique ; on risque alors de dépasser ainsi le stade désiré pour aboutir aux catéchines (I).

De plus, la réactivité des H en 6 ou 8 du cycle phloroglucinol sur les hydroxyles en 4 nouvellement formés au cours de la réduction, favorise la polymérisation.

Enfin, si le borohydrure de sodium s'avère le réducteur spécifique pour cette réaction, il a l'inconvénient d'induire la formation de complexes du bore avec les fonctions hydroxyles . La décomposition de ces complexes risque à nouveau de provoquer une polymérisation.

Cependant, ces obstacles levés, on peut obtenir le leucocyanidol monomère . L'étude de son comportement chromatographique , de ses réactions colorées avec les révélateurs des polyphénols et des flavanes, de sa condensation avec les catéchines, s'est montrée d'un grand intérêt pour l'analyse des tanins de la vigne et du vin .

2° - Propriétés

Nous devons surtout retenir l'instabilité de ce produit . Il se présente, dès son obtention par synthèse, sous forme d'une poudre blanche microcristalline . Rapidement, en quelques semaines, sa teinte passe au brun rouge . Pour lui conserver son aspect primitif il est nécessaire de le garder, sous vide, à l'abri de la lumière et à une température de - 20° .

Sa solution aqueuse est également peu stable. En présence d'ion H^+ on assiste à la formation, en quelques minutes, d'un abondant précipité, qui ne migre plus par chromatographie sur papier avec une solution aqueuse d'acide acétique à 2 % comme solvant, ce qui indique qu'il est alors polymérisé .

Il semble de plus que son oxydation soit favorisée par la présence d'alcool éthylique car les solutions éthanoliques deviennent plus rapidement colorées .

On peut donc, en présence d'une telle instabilité , légitimement penser qu'il est peu vraisemblable que ce corps existe sous cette forme dans les vins, liquides à la fois aqueux, alcooliques, et acides .

D - LES OLIGOMERES

A mi-chemin entre le monomère instable et les polymères inactifs, il existe des produits de faible condensation, comportant seulement quelques molécules élémentaires .

On peut là encore distinguer entre oligomères leucoanthocyaniques purs et ceux comportant une ou plusieurs molécules de catéchines .

ROUX (87), le premier, donna des références précises sur le comportement chromatographique des oligomères leucoanthocyaniques .

(voir Tableau page suivante)

	Ac. acétique 2 %	Butanol saturé d'eau
Monomère	0, 52	0, 59
Dimère	0, 40	0, 55
Trimère	0, 22	0, 42
Pentamère	0, 12	0, 20
Décamère	0	0

(Selon ROUX et PAULUS, 87)

FORSYTH (14) montra ensuite la présence de catéchine parmi les produits de dégradation des anthocyanogènes . A la suite des travaux de cet auteur (15, 16) il n'était plus possible de considérer la catéchine comme un artéfact de préparation provenant de la réduction, au cours de l'isolement, d'une molécule de leucocyanidol .

Après l'isolement en 1953 par FORSYTH d'un dimère dans le cacao, on a assisté à la caractérisation de ces molécules dans de nombreux autres végétaux: en particulier la fraise (11, 12), l'aubépine (43, 45) , la pomme (34, 35, 95), et dans certains produits alimentaires d'origine végétale tels que la bière (26) ou le chocolat (54) . La présence de ces oligomères a été reconnue dans le pépin de raisin (37) et pressentie dans les vins rouges (91) .

Ces produits sont relativement stables, puisqu'ils ont pu être isolés des végétaux par des méthodes chimiques .

Leur structure est encore discutée . Toutefois GEISSMAN (21) propose le schéma XIII (liaison C_4-$C_{6''}$ ou $C_{8''}$) qui convient le mieux à ses conclusions expérimentales . Ce schéma permet également de comprendre pourquoi ces dimères sont plus stables que les dérivés purement leucoanthocyaniques correspondants . En effet l'absence d'hydroxyle en C_4 bloque le processus de liaison par catalyse acide : il ne faut pas oublier toutefois que la polymérisation peut se poursuivre par un mécanisme oxydatif .

Le nombre des oligomères catéchiques isolés des végétaux augmentant sans cesse, on peut se demander si en l'absence de monomère, ces formes peu polymérisées ne correspondraient pas à l'état naturel des leucoanthocyanes .

E - PROPRIETES PHYSIOLOGIQUES

La notion de facteur vitaminique P fut à l'origine même de l'identification des leucoanthocyanes dans les vins par MASQUELIER (59) . Cet auteur avait déjà, à l'occasion de recherches sur plusieurs autres extraits végétaux, étudié les propriétés de ces substances (49, 50, 55, 56) .

Mais l'activité biologique des leucoanthocyanes déborde largement ces propriétés vitaminiques . On a mis en évidence une action sur le métabolisme lipidique, des propriétés hypotensives, détoxicantes (75), et également une activité bactéricide , plus marquée pour les formes monomères (53) .

De même , MASQUELIER et coll. (58, 70) ont montré que l'activité vitaminique P était propre aux formes peu condensées et s'estompait à mesure que croissait le degré de polymérisation .

Il devenait donc essentiel, sur le plan de l'activité physiologique, de préciser l'état des leucoanthocyanes dans le vin . Ce que nous avons dit plus haut de l'état naturel des leucoanthocyanes, devait nous amener à penser que des formes oligomères, actives et stables, pouvaient exister dans le vin .

CHAPITRE III
LES TANINS DE LA VIGNE ET DU VIN

°°°

L'importance des tanins, que nous venons de rappeler, a depuis longtemps incité les chercheurs à les caractériser et aussi à les doser dans le vin .

A - DIFFICULTES D'ISOLEMENT .

La plupart des végétaux sont riches en polyphénols de toute nature ; le raisin ne fait pas exception . De plus, au cours des extractions, ou tout au long des processus de fermentation qui aboutissent à des produits tels que le vin, de nombreuses substances peuvent prendre naissance . En fait l'instabilité naturelle de tous ces polyphénols risque de provoquer la disparition de certains d'entre eux, et, à l'inverse, l'apparition d'artéfacts de préparation . Dès lors on comprend que l'isolement des leucoanthocyanes de milieux aussi complexes que le vin, soit un problème analytique particulièrement difficile . En 1958, ROUX (84) écrivait :

" les leucoanthocyanes simples ou flavanediols -3, 4 peuvent être isolés lorsqu'ils existent en assez forte concentration . En revanche l'analyse des mélanges de leucoanthocyanes complexes et d'autres polyphénols devient une tâche des plus redoutables, même avec l'aide

" des techniques les plus modernes de la chromatographie et du contre-courant" .

Encore écrivait-il cela des leucoanthocyanes à noyau résorcinol (non hydroxylé en C_5) dont la tendance à la polymérisation est beaucoup plus réduite .

La richesse des vins rouges en anthocyanes , responsables de leur couleur, accroît cette difficulté . Dans les vins jeunes, particulièrement riches, la séparation des polyphénols est difficile ; elle devient peut-être plus facile dans les vins âgés, chez lesquels les "tanins" deviennent prépondérants . Cette séparation est rendue encore plus délicate dans les vins jeunes, par le fait que les anthocyanes peuvent être adsorbés sur les tanins (47). Par l'emploi de gels de dextrane, SOMERS (88, 89) a caractérisé plusieurs fractions tanniques auxquelles étaient incorporés des anthocyanes .

Dans les vins blancs, l'absence des anthocyanes facilite l'étude des leucoanthocyanes . C'est d'ailleurs dans les vins blancs que furent mis en évidence les premiers leucoanthocyanes des vins (59) . L'étude y est intéressante, d'abord pour reconnaître l'activité biologique de ces substances, mais également parce qu'elle concerne directement la technologie des vins blancs . Selon CANTARELLI (6, 7, 8) ces polyphénols seraient responsables des phénomènes de brunissement et de madérisation.

Devant la complexité du mélange de polyphénols tel que celui réalisé par le vin, il serait donc chimérique d'escompter une séparation par les méthodes chimiques traditionnelles . Ceci explique, en partie, le retard qu'a connu la connaissance de ce groupe de substances . Or, il est indispensable de réaliser cette séparation pour mieux évaluer le degré de polymérisation des leucoanthocyanes .

On a d'abord tenté cette évaluation par des dosages chimiques : ainsi sont définis divers indices calculés à partir de déterminations colorimétriques . Mais

le mécanisme de la nature exacte des substances sur lesquelles étaient pratiqués ces essais, explique l'imprécision des résultats . Nous décrirons d'abord succinctement ces essais chimiques, avant de montrer les progrès dûs à la chromatographie et l'emploi des substances témoins mieux définies, qui permettent de déterminer le degré de condensation avec beaucoup plus de précision .

B - DOSAGE DES TANINS DANS LES VINS PAR FORMATION D'ANTHOCYANIDOLS .

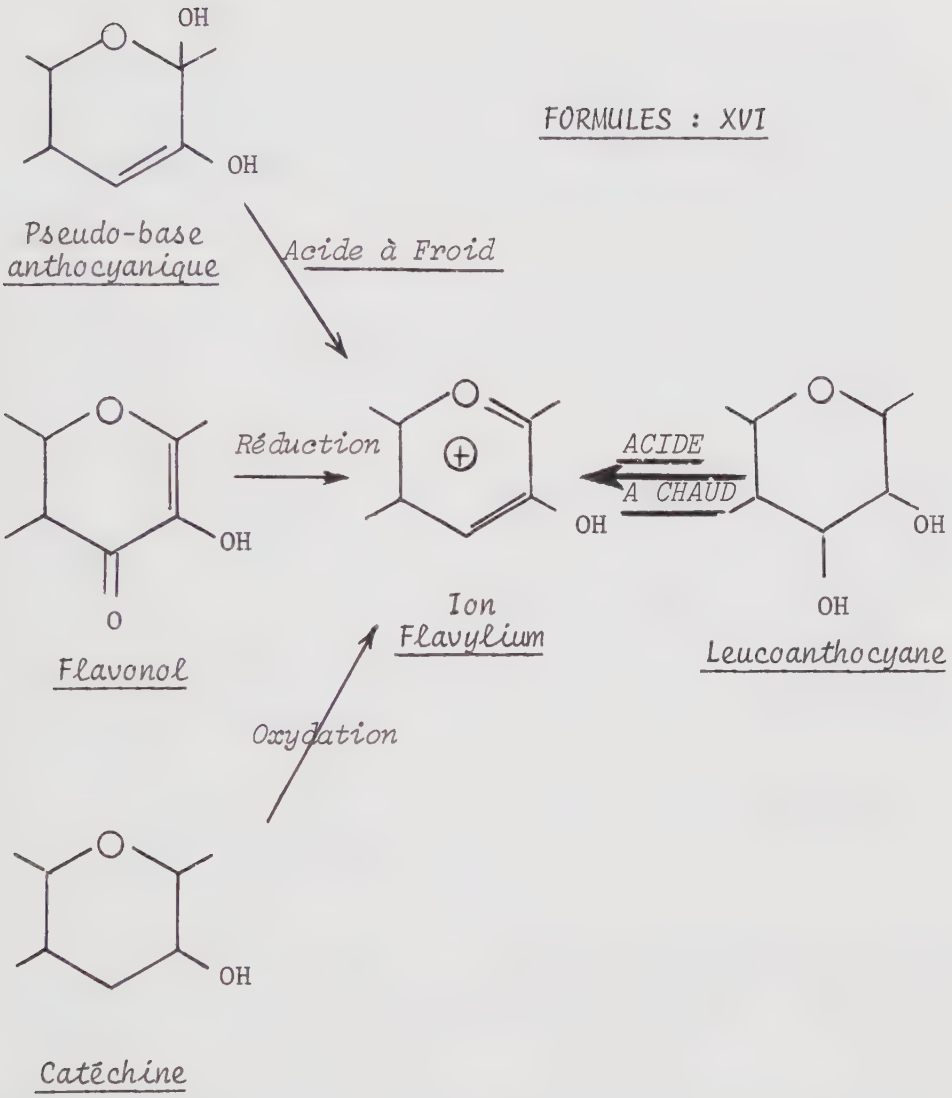
En pratique oenologique, on dose encore de nos jours le tanin du vin par la mesure de l'indice de permanganate (76) . Il est bien évident que ce procédé, nullement spécifique, ne fournit qu'un indice global s'appliquant indifféremment à tous les polyphénols réducteurs .

On lui préfère actuellement les méthodes colorimétriques, en particulier celle de TAYEAU, MASQUELIER et LEFEVRE (94) , qui reposent sur la transformation des leucoanthocyanes en pigments anthocyaniques .

En effet, si plusieurs flavonoïdes peuvent , par des réactions diverses, conduire à un anthocyanidol, seuls les leucoanthocyanes exigent à la fois le chauffage et un milieu acide (Formules XVI) .

. . . . .

FORMULES : XVI



Cette méthode a donné lieu à de nombreux travaux et a souvent été mise à profit pour le dosage des leucoanthocyanes dans les extraits végétaux . Divers auteurs se sont efforcés de la mieux codifier (22, 24, 36, 46, 67, 71, 72, 74, 93). Elle a été appliquée aux vins par MASQUELIER et coll. (60) et RIBEREAU-GAYON (78).

Son mécanisme fut étudié dès la découverte des flavanediols (1, 39, 40, 82) . On admet actuellement qu'il s'agit d'une élimination d'eau par catalyse acide accompagnée d'une oxydation . La présence d'oxygène semble en effet indispensable au développement de la coloration .

Ce mécanisme n'est pas simple . De là découlent ses inconvénients . En effet les conditions opératoires influent considérablement sur le rendement de la transformation . Le chauffage en milieu acide provoque d'abord la formation abondante de phlobaphènes, qui diminuent d'une part la quantité correspondante d'anthocyanidol, et d'autre part apportent des colorations brunes parasites . De plus le rendement en cyanidol n'est pas quantitatif (24) il dépend :

- du solvant employé (Eau , n-Butanol, Propanol Méthylpyrolidone)
- de la proportion d'acide
- du degré de polymérisation .

Cette dernière constatation revêt une certaine importance . Elle pourrait, en effet, suggérer une méthode d'étude du degré de polymérisation .

STOCKER (90) , au moyen de produits de synthèse, a étudié les rendements des diverses structures : Monomère : 41% - Dimère : 19, 9 % - Trimère : 13, 5 %- Tétramère : 10 % - Pentamère : 8 % .

GRAMSHAW (25) semble infirmer ces résultats en donnant des valeurs sensiblement différentes . En affectant au monomère la valeur 100 il trouve : 72 pour le dimère, 86 pour un polymère synthétique et 68 pour un polymère naturel de la bière . De toutes façons, il n'est

pas possible d'utiliser le rendement en anthocyanidol pour étudier le degré de polymérisation : ce rendement varie avec les types de liaison entre molécules, et même la configuration des carbones 3 et 4 . GRAMSHAW (25) a examiné les différents cas pouvant se présenter .

On doit donc abandonner l'espoir d'utiliser le dosage des leucoanthocyanes par la méthode colorimétrique qui aboutit à la formation d'anthocyanidols, pour la détermination des structures . Il n'en reste pas moins que cette méthode demeure valable pour des comparaisons relatives .

C - EVALUATION DU DEGRE DE POLYMERISATION PAR L'INDICE V/LA ET V/FD .

La vanilline se combine avec le cycle benzénique selon un mécanisme classique . Le cycle doit être activé par la présence de plusieurs groupements hydroxyles. Ainsi le noyau phloroglucinol est particulièrement favorable . En revanche les flavanonols, qui possèdent un carbonyle en 4, ne réagissent pas . La condensation des aldéhydes sur les flavanes avait déjà été étudiée par HILLIS et coll. (33) pour en évaluer la polymérisation . En effet la condensation a lieu sur les hydrogènes des carbones 6 et 8 du cycle phloroglucinique qui sont activés en milieu fortement acide . Ce sont ces mêmes hydrogènes , nous l'avons vu (Chap. II B, D), qui sont éliminés au cours des liaisons C_4-$C_{6'}$ (ou $C_{8'}$) et $C_{6'}$-C_6 (ou C_8) à chaque étape de la polymérisation . Dans ces conditions on peut penser que la coloration fournie par la vanilline diminue avec le degré de polymérisation .

Les résultats fournis par la réaction à la vanilline sont habituellement exprimés sous forme d'indices, par le calcul des rapports V/LA et V/FD . Dans ces formules V représente les résultats de la réaction à la vanilline, LA le dosage des leucoanthocyanes par formation

d'anthocyanidols et FD le dosage des groupes phénoliques libres par le réactif de FOLIN et DENIS . Le premier rapport V/LA tenterait d'évaluer le pourcentage global des molécules de leucoanthocyanes et celui des molécules dont le cycle phloroglucinique est engagé dans des liaisons de polymérisation . Le deuxième rapport V/FD essayerait de pallier les difficultés de dosage des leucoanthocyanes par la transformation en anthocyanidols, en le remplaçant par une évaluation globale des hydroxyles phénoliques, qui, a priori, n'interviennent pas dans la condensation .

Ces rapports ont servi de point de comparaison pour l'estimation du degré de polymérisation de leucoanthocyanes de nombreux végétaux : Noix d'Arec (61) , Aubépine (44), Pomme (34), Prune et Raisin (73).

L'élégance de cette méthode ne doit pas cacher son imprécision . Tout d'abord, comme le note LEWAK (44) la détermination de LA est sujette à trop de variations. Il suffit de dénombrer les phénomènes mis en jeu dans cette réaction pour s'en convaincre : libération d'une unité flavane du polymère, oxydation suivie de déshydratation, le tout accompagné de formation de phlobaphènes . De plus le rendement varie suivant le degré de polymérisation et la correction à apporter part nécessairement d'une hypothèse sur cette valeur, ou au moins, dans les mesures comparatives, sur l'hypothèse que le degré de condensation est le même dans toutes les substances soumises à notre analyse, par exemple tous les vins .

Enfin la norme V n'est pas elle-même exempte de critiques puisque la vanilline réagit indifféremment aux leucoanthocyanes et aux catéchines (71) .

On peut voir, par un exemple emprunté aux travaux réalisés sur les tanins de la vigne et du vin, que , comme cela était à prévoir, les résultats de ces différentes méthodes se contredisent .

Au moyen du fractionnement par les solutions saturées de chlorure de sodium, on a pu montrer que dans les raisins, les leucoanthocyanes se polymérisent au cours

de la maturation (13), alors que dans le vin une fraction peu polymérisée reste stable tandis que les polymères diminuent (69) .

Par le rapport V/LA, ces résultats ont été confirmés pour le raisin (73) et contredits pour le vin (80, 81) .

Il ne faut donc pas escompter de l'emploi de ces méthodes chimiques des renseignements décisifs sur la polymérisation des leucoanthocyanes . Ils conservent, néanmoins, toute leur valeur comme paramètre analytique d'une substance particulière .

D - FRACTIONNEMENT PAR LES SOLUTIONS SATUREES

Une méthode, particulièrement intéressante dans la technologie de l'extraction des leucoanthocyanes, a été mise au point par MASQUELIER (48) .

Les produits de condensation des leucoanthocyanes à poids moléculaires élevés - ceux que l'on appelait les tannoïdes - sont solubles dans l'eau, contrairement aux produits de polymérisation encore plus élevée, les phlobaphènes, qui eux, sont insolubles . En fait les "tannoïdes" se trouvent en solution sous forme colloïdale. Il est donc possible de les précipiter en modifiant la concentration saline . Ainsi l'addition de chlorure de sodium jusqu'à saturation dans une solution comportant un mélange de leucoanthocyanes polymérisés à des degrés divers, provoque la précipitation, le relargage en quelque sorte, des produits les plus polymérisés . En revanche les substances faiblement condensées restent en solution .

Ainsi, dans le vin, par l'emploi de ce procédé ORTEGA (69) a pu caractériser une fraction leucocyanidol peu polymérisée après élimination d'un "tannoïde" . Les conclusions auxquelles parvient cet auteur doivent retenir notre attention :

" Le taux de leucocyanidol ne semble pas varier au cours du vieillissement des vins rouges contrairement à celui des polymères qui décroît en fonction du temps" .

C'est là une première indication que le vin doit contenir un leucoanthocyane peu polymérisé, et cependant stable .

E - TRAVAUX DE JOSLYN et DITTMAR (37) .

Nous avons noté (Chap. II, A, 4) que les leucoanthocyanes pouvaient être précipités de leurs solutions dans l'acétate d'éthyle par addition de solvants non polaires, miscibles en toutes proportions avec l'acétate d'éthyle, tels que le benzène, l'éther de pétrole, l'hexane .

Par addition progressive d'hexane , on peut réaliser ainsi une véritable précipitation fractionnée . Celle-ci s'avère particulièrement efficace pour éliminer les dérivés hydroxycinnamiques qui souillent très fréquemment les précipités de leucoanthocyanes .

JOSLYN et DITTMAR (37) ont décrit une application de ce procédé aux grains de raisins Pinot blanc et ont réussi à en extraire un anthocyanogène qui semble relativement homogène .

Le principe de cette méthode est le suivant : les pépins de raisin sont d'abord longuement extraits à l'hexane, au moyen d'un appareil de SOXHLET, pour éliminer les lipides, puis à l'éther éthylique pour enlever les catéchines libres . Les anthocyanogènes sont alors dissous par macération dans le méthanol . On chasse le méthanol par distillation à basse température et le résidu aqueux est extrait par de l'acétate d'éthyle . Sur cet extrait convenablement concentré, on applique la méthode de précipitation fractionnée par l'hexane et on recueille ainsi une

fraction anthocyanogène, dont on vérifie ensuite l'homogénéité et le comportement par chromatographie sur papier.

Il est bien évident que les anthocyanogènes du vin proviennent du raisin (79) . L'étude préliminaire de ces produits extraits du raisin devait nous apporter le moyen d'approfondir nos connaissances sur la fraction qui est passée dans le vin .

Nous avons donc d'abord reproduit la méthode de JOSLYN sur des pépins de raisins afin d'obtenir des références chromatographiques nous permettant de caractériser ultérieurement ces produits par les mêmes méthodes, mais cette fois-ci dans le vin, ce qui représentait le but de notre travail .

CHAPITRE IV
TRAVAUX PERSONNELS

°°°

A la lumière des résultats obtenus antérieurement, il nous est donc apparu intéressant d'étudier la nature des formes peu condensées des anthocyanogènes du vin . Les deux questions auxquelles nous nous sommes proposé de répondre pouvaient s'exprimer ainsi :

a) Le leucocyanidol monomère existe-t-il à l'état naturel dans le vin ?

b) S'il en est absent, sous quelle forme oligomère le leucocyanidol est-il stabilisé dans le vin, puisque l'activité vitaminique P, qui n'appartient plus aux formes condensées, est cependant conservée dans les vins rouges ?

A - RECHERCHE DU LEUCOCYANIDOL MONOMERE DANS LE VIN

La présence du leucocyanidol monomère dans les vins rouges avait été envisagée dans un travail de MASQUELIER et coll. (57) , après examen de chromatographies sur papier d'un extrait du vin . Les Rf élevés (de l'ordre de 0,50) avec l'acide acétique en solution

aqueuse à 2 % comme solvant, avaient amené ces auteurs à penser qu'ils étaient en présence de formes peu condensées, voire monomère . Cela en conformité avec les résultats fournis par ROUX (87) (Cf. Tableau p.21) .

Ce travail avait été réalisé avant que l'on puisse disposer du leucocyanidol monomère de synthèse . Une fois connue l'instabilité chimique de ce corps, rappelée plus haut, sa présence dans le vin devenait hautement improbable .

Pour obtenir une certitude à ce sujet, nous avons essayé de le mettre en évidence par chromatographie sur colonne .

De nombreux supports ont été utilisés pour l'étude des polyphénols par chromatographie sur colonne . Les gels de dextrose, que nous avons déjà signalés ont été utilisés par WOOF (98) pour la séparation des substances responsables des troubles de la bière . La cellulose a retenu l'attention de plusieurs expérimentateurs (28, 62, 69) .

Cependant le matériau de choix semble être le nylon . En effet il existe une similitude entre la liaison polyamide-polyphénol et la liaison protéine-polyphénol . Cette liaison, comme pour les protéines, peut être d'autant plus rigide que le poids moléculaire du polyphénol est plus élevé . L'élution des produits phénoliques va donc être fonction de leur poids moléculaire . D'où une possibilité de séparation .

Cette propriété des nylons de "capter" les polyphénols est maintenant bien connue puisqu'elle est à la base des produits industriels, comme le nylon 66, qui permettent de stabiliser les bières, en éliminant par filtration les polyphénols qui sont les précurseurs du trouble de la bière par combinaison avec les protéines . Dans le domaine analytique, MASQUELIER (51) a utilisé cette propriété pour isoler et doser le leucocyanidol des vins blancs . Ces vins blancs sont d'ailleurs justiciables de traitement par le nylon pour la prévention de leur brunissement (20) .

STOCKER (90) a utilisé une colonne de polyamide pour la purification de leucocyanidol monomère de synthèse . L'élution du monomère est, conformément à la théorie, plus facile que celle des oligomères et des polymères .

1°- Technique .

On peut utiliser, soit la polyamide pure, soit la polyamide mélangée à la célite . L'emploi de deux absorbants peut en effet améliorer la séparation, la célite favorisant la rétention des composés hydrosolubles, la polyamide s'y opposant, comme cela a été noté pour les anthocyanes (9) .

Polyamide-célite

On utilise 1 gramme de polyamide Woelm pour 2 grammes de Célite . Le mélange est mis en suspension dans 20 ml d'eau et versé avec les précautions habituelles dans une colonne Quickfit 12/10 . La colonne obtenue a 10 cm de hauteur et 10 mm de diamètre . On introduit alors en tête de colonne 5 ml de vin . La colonne est lavée avec 10 ml d'eau avant de commencer l'élution avec de l'éthanol à 95c/96c . L'éluat éthanolique est recueilli par fraction de 1 ml avec une vitesse d'écoulement de l'ordre de 0,5 ml par minute . Le passage des polyphénols est vérifié d'abord sommairement, dans une petite partie des éluats, par la coloration verte que donnent les o-diphénols avec une solution de perchlorure de fer à 2 % dans l'éthanol . Seules les fractions réagissant avec ce réactif sont analysées .

Avant de conclure à l'absence de leucocyanidol monomère dans le vin, il était nécessaire de connaître la sensibilité de cette méthode . Pour cela nous avons préparé quatre solutions de leucocyanidol monomère de synthèse titrant respectivement : 0,5 g par litre, 0,2 g par litre, 0,1 g par litre et 0,02 g par litre .

Nous avons chromatographié sur colonne de polyamide-célite 5 ml de chacune de ces solutions comme indiqué plus haut . Le leucocyanidol a été identifié dans les éluats réagissant avec le perchlorure de fer, et par co-chromatographie avec du leucocyanidol monomère dans l'acide acétique à 2 % (Rf. 0,49) .

De la même façon on a pu caractériser la présence de la (+)-catéchine (Rf 0,42) et de la (-) - épicatéchine (Rf 0,35) . Les révélations sont faites par le réactif de BARTON modifié par MICHAUD (64) qui est un réactif particulièrement sensible des polyphénols, ou encore avec la solution alcoolique à 5 % d'acide p. toluène sulfonique .

Nous avons noté que le leucocyanidol monomère était élué dans les fractions n°9 à 20 (1 ml) . Cette caractérisation était encore parfaitement nette pour 5 ml de solution contenant 0,02 g par litre de leucocyanidol . Il est donc bien évident que l'on devait pouvoir caractériser par cette méthode le leucocyanidol monomère dans le vin . Le taux global des leucoanthocyanes est en effet de l'ordre de 3 g par litre . Il serait donc possible de l'y déceler, même s'il ne représentait que 1 % de la totalité des leucoanthocyanes .

Il est d'ailleurs possible de reculer encore la limite de la sensibilité de cette méthode par l'emploi d'une colonne plus importante : 15 grammes de polyamide et 30 grammes de célite . La quantité de vin mise en œuvre peut alors être portée à 75 ml.

Polyamide pure

La préparation de la colonne se fait selon les indications données par STOCKER (90) : 9 grammes de polyamide Woelm sont mis en suspension dans 5 à 6 fois leur poids d'eau . On laisse gonfler une à deux heures . Le mélange est privé des bulles d'air par agitation sous vide . La bouillie, ainsi préparée, est soigneusement mélangée, sans introduction de nouvelles bulles d'air, puis versée d'un seul coup dans le tube de chromatographie (Quickfit

12/10) . La colonne obtenue a 10 cm de hauteur et 10 mm de diamètre . Elle est lavée par 60 ml d'un mélange diméthylformamide-Eau-Ethanol (10/20/30) puis par 150 ml d'eau . Le produit à analyser est déposé sous forme de solution aqueuse ou éthanolique . Après lavage à l'eau, les polyphénols sont élués par des solvants dont la polarité est soigneusement calculée pour éluer sélectivement des polymères de plus en plus condensés :

- Monomère : Ethanol
- Dimère et trimère : Méthanol-Diméthylformamide (95/5)
- Tétramère : Méthanol-Diméthylformamide (90/10)
- Pentamère : Méthanol-Diméthylformamide (80/20)

La colonne ainsi préparée a été testée, soit avec du leucocyanidol monomère, soit avec du leucocyanidol partiellement polymérisé . On a retrouvé les différentes fractions conformément aux résultats de STOCKER (90) . La sensibilité est du même ordre de grandeur que celle obtenue avec la colonne de polyamide-célite .

2°- Résultats et discussion.

Dans les 17 vins rouges examinés (vins du Haut-Médoc et vins de pays de Lot-et-Garonne) nous n'avons jamais réussi à mettre en évidence une fraction monomère .

On pourrait toutefois objecter que la comparaison se fait avec un produit de synthèse . Le passage à une expérimentation sur des produits naturels peut apporter de notables différences .

A l'appui de notre thèse, nous devons faire remarquer que, bien que le volume des prises d'essais soit faible, nous avons régulièrement retrouvé sur les chromatogrammes de contrôle les taches de (+) -catéchine et de (-)-épicathéchine . Dans ces conditions, il ne nous paraît pas exagéré de conclure que si le leucocyanidol monomère se trouve dans le vin, il ne peut y être à une

concentration égale ou supérieure à celle de la solution la plus diluée qui nous a donné une réponse positive, à savoir de 0,02 g par litre .

A cette dilution son activité physiologique serait quasiment nulle . Puisque cette activité est cependant réelle, il faut donc que le vin contienne une substance que nous devons chercher à un échelon supérieur dans la série des anthocyanogènes . Le vin ne contiendrait-il pas des fractions leucoanthocyaniques oligomères ?

B - ISOLEMENT DES ANTHOCYANOGENES OLIGOMERES DE LA BAIE DE RAISIN .

Le vin est un produit de transformation : il provient de la fermentation du jus sucré du raisin, accompagnée d'une macération des parties solides de la grappe, pellicule, pépins, rafle . L'origine des tanins présents dans les vins doit être cherchée dans les parties ligneuses où ils se trouvent à l'état naturel . En conséquence les vins rouges seront plus riches en tanins que les vins blancs, qui n'ont pas subi de macération . BATE-SMITH et coll. (4) ont les premiers souligné l'importance des organes ligneux .

Les leucoanthocyanes ont été retrouvés en abondance dans les épicarpes des baies et dans les rafles (59) . Les pépins également renferment des quantités importantes de ces substances (5, 8, 73) .

Avant de les caractériser dans les vins, il était logique de les isoler des pépins où ils se trouvent en plus grande abondance . Ainsi, après étude de leur comportement chromatographique, nous serions mieux à même de les retrouver dans le vin .

1°- Principe

Nous avons utilisé la méthode de JOSLYN et DITTMAR (37), que nous avons simplifiée pour l'adapter à des quantités de matière première plus réduites . Le principe de la méthode originale est le suivant :

Les pépins sont soumis à une extraction par l'hexane, à l'appareil de SOXHLET pendant 48 heures, puis par l'éther pendant 60 heures . Ils sont mis alors à macérer dans du méthanol aqueux (70%) . Après avoir chassé ce méthanol, on procède à une extraction par l'acétate d'éthyle de la phase aqueuse . Le fractionnement des polyphénols se fait par précipitation fractionnée au moyen de l'hexane, tout d'abord à deux reprises par de petites quantités pour éliminer les impuretés non flavaniques , puis par une quantité plus importante qui permet d'obtenir un précipité d'un poids voisin de 10 grammes . Ce produit, après dissolution dans l'acétate d'éthyle, est précipité à nouveau par l'hexane . Le résidu aqueux, restant après extraction par l'acétate d'éthyle est traité par le butanol . Nous avons, pour notre part, abandonné cette dernière opération. En effet JOSLYN et DITTMAR (37) reconnaissent que cette dernière extraction ne leur permet pas d'obtenir , avec les pépins, des taches chromatographiques différenciées . De plus, avec les épicarpes, il s'agissait pour eux surtout de chercher s'il existait des glucosides du leucocyanidol, ce qui n'est pas notre propos . Signalons enfin que le solvant et le papier employés pour l'analyse chromatographique des fractions obtenues sont différents .

Nous avons traité par cette méthode des baies de plusieurs provenances :

- Raisins blancs :
  . Chasselas et Muscat
- Raisins rouges :
  . Alphonse Lavalée
  . Grand noir de la Calmette
  . Cabernet Sauvignon
  . Seibel 5455 .

Les cépages blancs ont permis la recherche des anthocyagènes dans les épicarpes , car la grande richesse des raisins rouges en anthocyanes ne permet pas de le faire correctement .

2°- Partie expérimentale .

On sépare d'abord les épicarpes et les pépins. Ces deux parties sont soigneusement lavées afin de bien les débarrasser de leur pulpe . Elles sont ensuite rapidement séchées dans un courant d'air .

Traitement des épicarpes

On procède à trois macérations successives de 12 heures dans le méthanol, à froid, à l'obscurité et dans toute la mesure du possible à l'abri de l'air . La quantité d'alcool est fonction du poids des épicarpes . Par exemple 500 ml pour 100 grammes. Elle doit être suffisante pour les recouvrir dans les récipients qui les contiennent. Les solutions alcooliques sont réunies, et, après avoir ajouté 300 ml d'eau, on les concentre, sous pression réduite, à 300 ml. Ce liquide est extrait à 5 reprises par 100 ml d'éther éthylique . La phase aqueuse, débarrassée de l'éther par agitation sous pression réduite, est ensuite traitée par 6 fois 75 ml d'acétate d'éthyle . Celui-ci est recueilli sur sulfate de sodium déshydraté . La solution organique, concentrée à 25 ml, est ainsi prête pour le fractionnement par l'hexane . Après une première précipitation par 8 ml d'hexane, dont le précipité est rejeté, on ajoute au liquide centrifugé 33 ml d'hexane . Ce précipité est redissous à trois reprises dans 5 ml d'hexane, puis reprécipité chaque fois par 7, 5 ml d'hexane , avant d'être lavé par trois fois 7, 5 ml d'hexane pour bien le débarrasser de l'acétate d'éthyle . Ce précipité, comme nous le verrons, constitue la fraction oligomère leucoanthocyanique .

Traitement des pépins .

Après broyage rapide au moulin électrique, ils sont séchés en les plaçant sous vide phosphorique pendant 48 heures . On obtient ainsi une poudre, qui, additionnée d'une partie de sable lavé afin de réaliser une bonne extraction, est placée dans une cartouche de SOXLHET. On extrait à l'hexane pendant 48 heures et ensuite à l'éther pendant 48 heures . L'hexane débarrasse les pépins des lipides qui y sont abondants et l'éther élimine les catéchines . Il n'est pas possible de réduire davantage les durées d'extraction . En deçà de ce temps les catéchines ne sont pas éliminées en totalité . De toutes façons l'absence de catéchines est contrôlée par l'absence des taches correspondantes sur les chromatographies en deux dimensions (voir figure IV) .

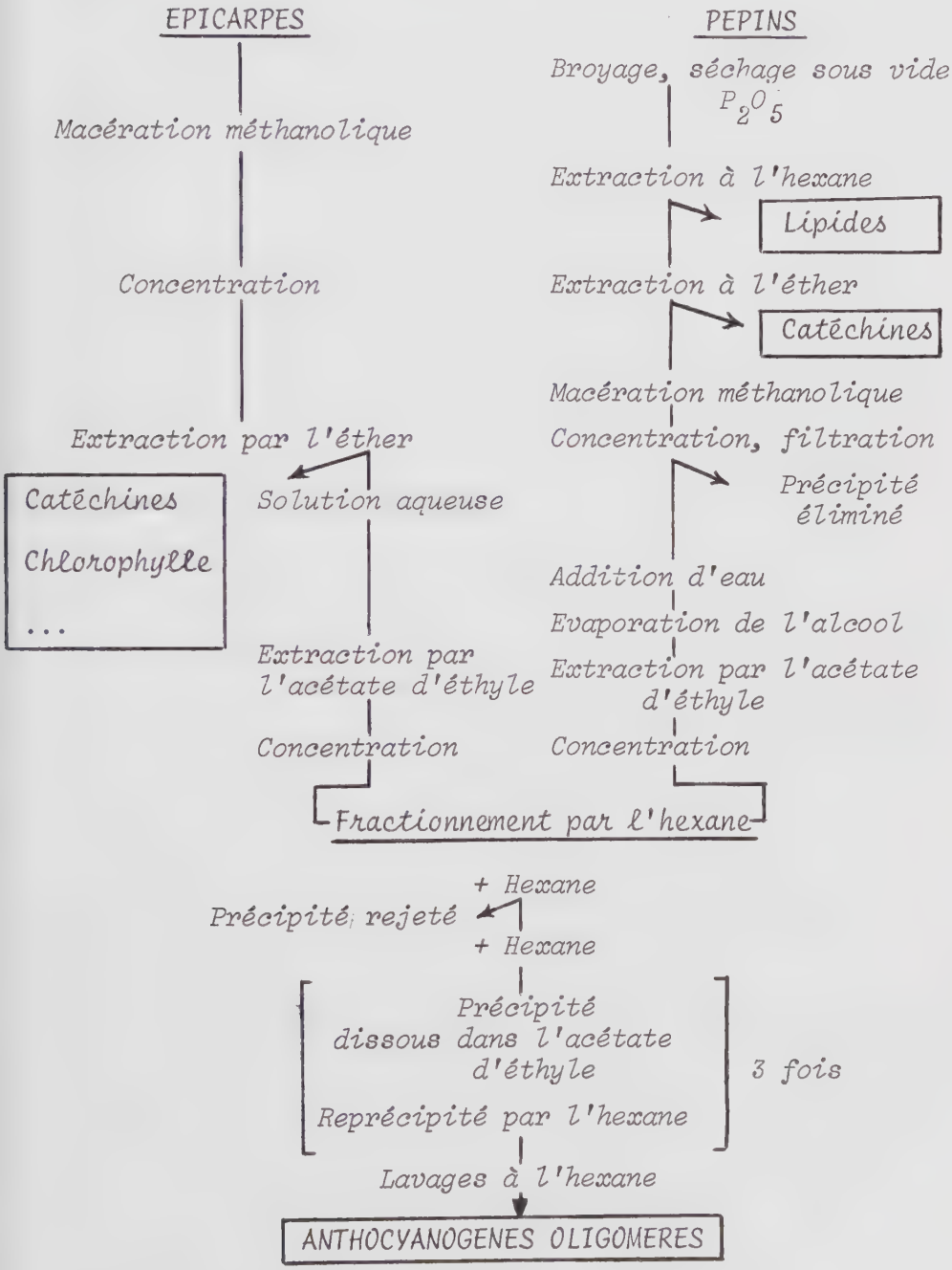
La poudre sèche est mise à macérer à trois reprises dans le méthanol à 70%, comme les épicarpes. Les fractions alcooliques sont concentrées à 10 ml et laissées une nuit à 0° . Un précipité se forme qui est éliminé par filtration . On ajoute 25 ml d'eau, et, après avoir chassé l'alcool par évaporation sous pression réduite, la solution aqueuse est extraite par 6 fois 25 ml d'acétate d'éthyle . Recueilli sur sulfate de sodium déshydraté, cet extrait est concentré à 25 ml et filtré .

(Figure I page suivante)

Figure 1

TRAITEMENT DES BAIES DE RAISIN

ADAPTATION DE LA METHODE DE JOSLYN ET DITTMAR (37)



On pratique alors une précipitation fractionnée par l'hexane de la même façon que plus haut, à savoir, addition de 8 ml d'hexane, rejet du précipité, nouvelle addition de 33 ml d'hexane, purification du précipité obtenu par dissolution dans l'acétate d'éthyle et précipitations par l'hexane répétées trois fois et enfin lavages à l'hexane.

Dans toutes les opérations ci-dessus nécessitant une élévation de température nous avons pris soin que celle-ci ne dépasse pas 35° pour éviter toute altération .

Les rendements sont faibles et difficilement appréciables, les quantités obtenues sont cependant suffisantes pour une analyse qualitative par chromatographie . Sur les deux précipités obtenus, soit à partir des épicarpes, soit à partir des pépins, on a pratiqué les essais suivants :

- Une partie est chromatographiée avant tout traitement.
- Une deuxième partie est soumise à une hydrolyse ménagée . Le résultat de la chromatographie des produits d'hydrolyse est confronté à la première chromatographie .
- La dernière partie est traitée par l'acide chlorhydrique plus concentré à chaud et les anthocyanidols formés sont déterminés par chromatographie .

3°- Analyse chromatographique .

Méthode

En chromatographie unidimensionnelle sur papier , nous avons retenu les solvants suivants qui nous ont donné les meilleurs résultats pour la séparation des flavanes :

- n-butanol-acide acétique-eau (4/1/2, 2) (B. A. W.)
- n-butanol-acide acétique-eau (6/1/2, 2)
- acide acétique-eau (2/98) .

En chromatographie ascendante et sur papier Arches 304 le front du solvant était généralement amené à 15 cm. En chromatographie descendante, pour obtenir une séparation plus efficace la chromatographie était prolongée jusqu'à 40 cm .

Pour la caractérisation des anthocyanidols, nous avons utilisé le papier Whatman n°1 et le solvant maintenant classique de FORESTAL : acide acétique-acide chlorhydrique-eau (30/3/10). Le développement se fait sur 15 cm à l'obscurité .

En chromatographie bidimensionnelle nous avons utilisé le système de solvants suivants :

- 1ère dimension :
  . n-butanol-acide acétique-eau (4/1/2, 2)
- 2ème dimension : acide acétique-eau (2/98).

Ce couple de solvants a déjà été utilisé pour les polyphénols par GOVINDARAJAN & MATHEW (23) , NATCHOMI & ALUMOT (68), ainsi que par d'autres auteurs (96, 42).

Certains chercheurs ont également utilisé en première dimension l'isobutanol saturé d'eau . Nous avons abandonné ce solvant qui conduit à d'importantes traînées .

Le front du solvant est mené à 20 cm sur papier Whatman n°3 MM . Des témoins sont ajoutés en marge pour repérer les taches .

La chromatographie en couche mince a, également été utilisée selon les techniques traditionnelles . Nous avons employé le gel de silice H de MERCK en couche mince de 0, 250 mm . Une activation préalable n'est pas indispensable . Le solvant Benzène-acide acétique-eau (10/10/1)B.Z.A. est utilisé à deux reprises : après

une première migration sur 10 cm, la plaque est séchée dans le courant d'air d'un ventilateur . On procède alors à une deuxième migration de 10 cm également . Ce procédé (11) permet une meilleure séparation des produits de Rf faible .

Produits de référence

- Monomères :

. (+)-catéchine et (-)-épicatéchine du commerce (produits FLUCKA).

. Leucocyanidol de synthèse préparé selon MICHAUD et coll. (66).

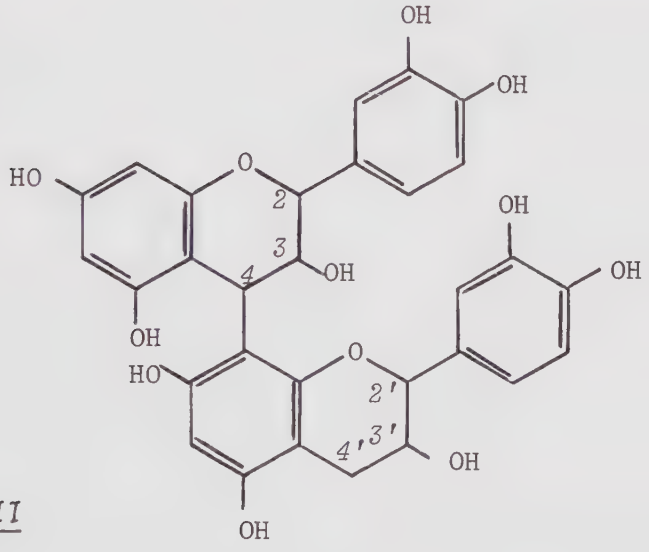
. Cyanidol : 2 mg de leucocyanidol de synthèse en solution dans 10 ml d'acide chlorhydrique à 20 % en chauffant au bain-marie bouillant pendant 30 minutes . On extrait le cyanidol formé par 0, 5 d'alcool isoamylique. Cette solution est définie comme témoin .

- Dimères : Nous avons préparé les dimères leucocyanidol-catéchine selon la technique de CREASY et coll. (11) .

. 20 mg de (+)-catéchine en solution dans 20 ml d'acide chlorhydrique 0, 4 N sont refroidis à 0° et maintenus dans un bain glacé . On ajoute alors 20 mg de leucocyanidol monomère de synthèse . Après exactement 5 minutes, l'acide chlorhydrique est extrait par agitation du mélange avec 20ml d'une solution N-N-di-n-octyl-méthyl-amine à 10% (v/v) dans le chloroforme. L'opération est renouvelée si le pH n'est pas ramené à 7 . La phase aqueuse séparée, éventuellement par centrifugation, est extraite par 4 fois 10 ml d'acétate d'éthyle. La solution organique, recueillie sur sulfate de sodium déshydraté, est évaporée à sec sous pression réduite à une température inférieure à 30° . Le résidu est repris par 1 ml de méthanol .

On peut opérer de la même façon en partant de 20 mg de (-) -épicatéchine .

La chromatographie unidimensionnelle sur papier, dans le B. A. W. comme dans l'acide acétique à 2%, fait apparaître, aussi bien pour le produit obtenu avec la (+)-catéchine que pour celui obtenu avec la (-)-épicatéchine, deux taches principales . Pour CREASY et coll. (11) il s'agit de stéréoisomères du composé XVII .



XVII

- Pour la (+)-catéchine :
  . CA : 2, 3-trans 3, 4-trans 2', 3'-trans
  . CB : 2, 3-trans 3, 4-cis 2', 3'-trans

- Pour la (-)-épicatéchine :
  . EA : 2, 3-trans 3, 4-trans 2', 3'-cis
  . EB : 2, 3-trans 3, 4-cis 2', 3'-cis .

Révélation des taches

Les procédés de révélation des polyphénols sont nombreux . Généralement ils font appel à leurs propriétés réductrices .

Il n'en est pas qui permettent de différencier, sans aucune équivoque , les leucoanthocyanes .

Pourtant, l'étude attentive des colorations fournies par certains d'entre eux, avec des échantillons de références authentiques, particulièrement le leucocyanidol monomère, nous ont permis de faire des constatations utiles pour cette caractérisation .

Nous avons utilisé les révélateurs suivants :

- Le perchlorure de fer :

. soit en solution à 1 % dans l'acétone par immersion des chromatogrammes sur papier ,
. soit en solution à 2 % dans l'éthanol en pulvérisation sur les chromatogrammes en couche mince .

Ce réactif, assez sensible, quoique non spécifique , permet de localiser les fractions phénoliques sur les chromatogrammes . En outre il rend possible une différenciation des catéchines qui donnent une coloration verte, des gallocatéchines, qui conduisent à des composés colorés en bleu-violet .

- Le réactif de BARTON modifié :

(solution acétonique de perchlorure de fer, puis solution acétone-eau de ferricyanure de potassium) utilisé selon les indications de MICHAUD (63) . Ce réactif forme des taches bleues avec tous les réducteurs . Sa très grande sensibilité peut s'avérer utile dans la détection de quantités infimes .

- La vanilline en solution chlorhydrique selon la formule de RIBEREAU-GAYON (80) . (pulvérisation d'une solution à 1 g de vanilline dans 10 ml d'acide chlorhydrique concentré) .

Nous avons vu plus haut que cette réaction était spécifique du noyau phloroglucinol des flavanes . Il n'est donc pas possible de distinguer par ce moyen les catéchines des leucoanthocyanes .

- Le réactif d' ERLICH (solution de p. diméthylaminobenzaldéhyde à 2 % (p/v) dans l'acide chlorhydrique 2 N)

Les hydroxyflavanes sont révélés en rouge sur les chromatogrammes avec cependant des nuances intéressantes à considérer . En effet la coloration des catéchines apparaît immédiatement . Mais, si la tache d' (-)-épicatéchine persiste assez longtemps celle de la (+)-catéchine disparaît assez vite .
En revanche le leucocyanidol est plus long à se révéler mais ensuite la couleur rose se maintient . Le problème de cette coloration transitoire avait déjà été pressenti par CLAVEAU (10) sans que cet auteur lui donne explication .

- L'acide p-toluène sulfonique (en solution éthanolique à 5 %) .

Ce réactif, dû à ROUX (83), est employé en pulvérisation sur le chromatogramme, lequel,une fois sec, est placé pendant quelques minutes dans une étuve à 100°.
L'observation attentive des couleurs obtenues, donne des renseignements précieux :
Les catéchines se colorent en brun violacé tandis que le leucocyanidol devient brun rosé . Bien qu'il s'agisse de nuances, la comparaison avec des témoins permet une différenciation précise entre les flavanols et flavanediols . Il est même possible, avec un peu d'habitude, de remarquer que la coloration de la tache des dimères leucocyanidol catéchine est intermédiaire entre celle formée par les deux composants .

Il faut cependant noter que l'acide p.toluène sulfonique peut réagir de manière analogue avec d'autres composés (23) : il ne peut donc à lui seul servir de critère d'identification des flavanes . Cependant associé à la transformation spécifique des leucoanthocyanes en anthocyanidols, il est d'un intérêt certain .

Nous nous sommes limité à l'emploi de ces révélateurs, bien qu'il en existe d'autres . En effet, ces derniers ne sont pas plus spécifiques et en conséquence n'apportent aucun élément nouveau .

4°- Résultats

Selon JOSLYN et coll. (37) , la graine et les épicarpes de Pinot blanc contiendraient un anthocyanogène. Nos expériences confirment ce résultat . Par précipitation fractionnée des extraits tant des épicarpes des raisins blancs que des graines de raisins rouges ou blancs, nous avons obtenu des précipités qui comportent une fraction leucoanthocyanique . En effet par chauffage avec de l'acide chlorhydrique ils fournissent une coloration rouge, qui peut être identifiée par chromatographie à un anthocyanidol .

Chromatographie avant hydrolyse

En technique unidimensionnelle, dans le solvant B. A. W. (4/1/2, 2), on obtient avec le précipité préparé à partir des pépins une tache importante entre les Rf 0, 36 et 0, 45 (fig. 2). Avec le solvant (6/1/2, 2) ces Rf deviennent 0, 25 et 0, 35 .

Avec les épicarpes les résultats sont identiques .

FIGURE 2

SCHEMA DE CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER
DE LA FRACTION LEUCOANTHOCYANIQUE OLIGOMERE
EXTRAITE DU PEPIN ET DE L'EPICARPE DE RAISIN

1. Fraction extraite du pépin
2. Fraction extraite de l'épicarpe
3. Dimères synthétiques leucocyanidol-(+)-catéchine
4. Dimères synthétiques leucocyanidol-(-)-épicatéchine
5. (+)-catéchine
6. (-)-épicatéchine
7. Leucocyanidol monomère

Solvant : B.A.W. (4/1/2,2).

En technique bidimensionnelle la définition des taches est peut-être un peu moins nette avec cependant une zone caractéristique se situant entre les Rf 0, 33 et 0, 46 en première dimension et 0, 30 et 0, 37 en seconde dimension (figure 4) .

En chromatographie sur couche mince de silice H, plus sélective, on assiste à un dédoublement en deux taches distinctes de Rf 0, 12 et 0, 27 (figure 3) .

L'examen des chromatographies ainsi obtenues (fig. 2, 3, 4) nous permet de conclure que :

1° - Il n'y a pas de catéchines libres dans la fraction oligomère isolée (fig. 2,1 2,2 3,1 4) .

2 - Cette fraction se présente après chromatographie sur papier sous forme d'une tache relativement bien individualisée (fig. 2, 1 et 2, 2) avec une migration comparable à celle des dimères synthétiques (fig. 2, 3 2, 4).

3 - En chromatographie en couche mince les deux taches ont le même Rf que les dimères synthétiques (fig. 3, 1 3, 2 3, 3) .

4 - On ne note pas de tache de Rf 0 par chromatographie dans l'acide acétique à 2 % (fig. 4) . La fraction isolée n'est donc pas fortement polymérisée .

Dans ces solvants acides le leucocyanidol monomère de référence est partiellement polymérisé (fig. 2, 7 et 3, 6) .

Chromatographie après hydrolyse ménagée

Elle a pour but de séparer les catéchines des leucoanthocyanes liés à l'intérieur des copolymères . Dans cette opération seules les catéchines, plus difficiles à polymériser, peuvent être isolées et caractérisées . Les flavanediols se retrouvent hautement polymérisés en fin

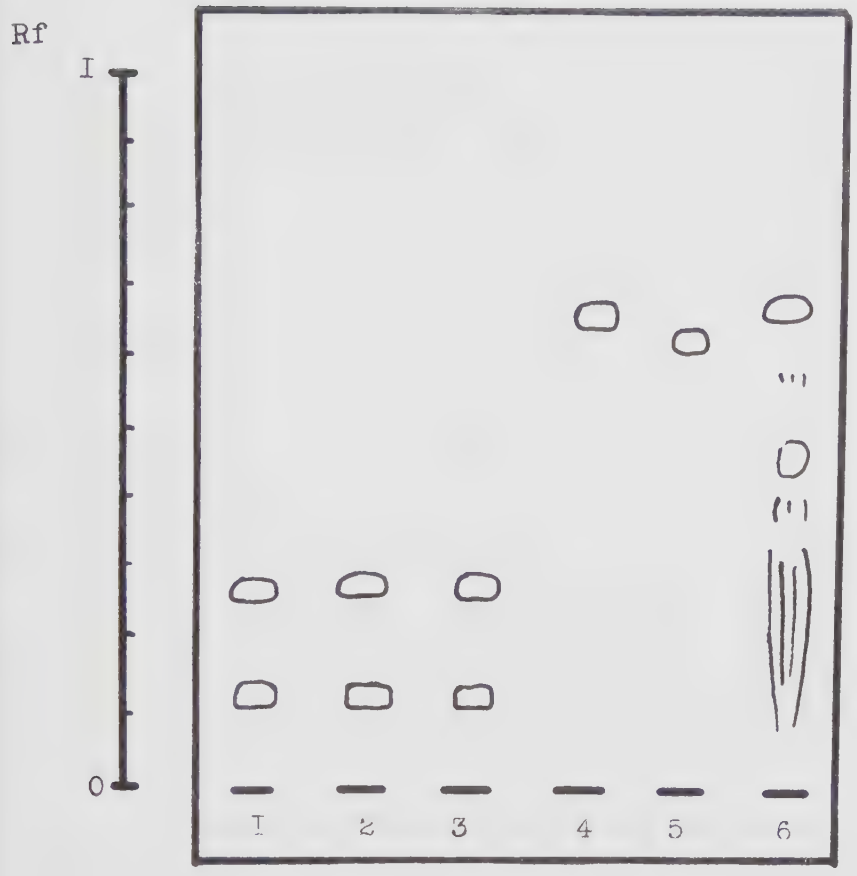


FIGURE 3

SCHEMA DE CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE DE SILICE H
DE LA FRACTION LEUCOANTHOCYANIQUE OLIGOMERE
EXTRAITE DES PEPINS DE RAISIN

1. Fraction extraite du pépin.
2. Dimères synthétiques leucocyanidol-(+)-catéchine
3. Dimères synthétiques leucocyanidol-(-)-épicatéchine
4. (+)-catéchine
5. (-)-épicatéchine
6. Leucocyanidol monomère

Solvant : Benzène-Acide acétique - Eau (10/10/1)
2 fois 10 cm.

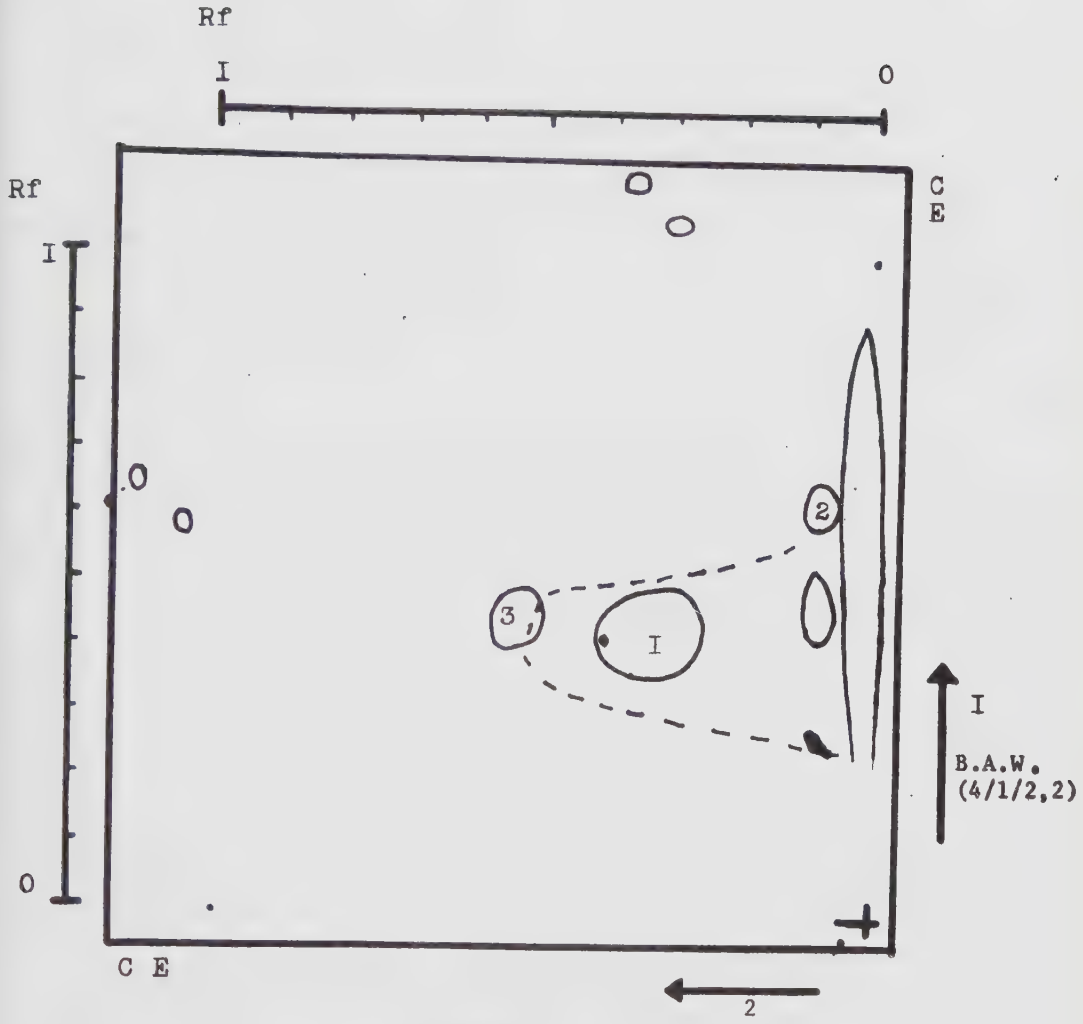


FIGURE 4

SCHEMA DE CHROMATOGRAPHIE BIDIMENSIONNELLE SUR PAPIER DE LA FRACTION LEUCOANTHOCYANIQUE OLIGOMERE EXTRAITE DU PEPIN DE RAISIN

1. Fraction leucoanthocyanique oligomère
2. Flavonoïdes
3. Anthocyanidols

C : Témoin (+)-catéchine
E : Témoin (-)-épicatéchine

d'hydrolyse . Ils constituent des taches de Rf nuls qui peuvent parfois être gênantes .

Une partie du précipité d'oligomères est dissoute dans 10 ml d'acide chlorhydrique 0, 1 N et portée au bain-marie à 100° . Des chromatographies successives, à 5 minutes d'intervalle, révèlent que la scission entre les molécules de leucoanthocyanes et de catéchines n'est totale qu'après trente minutes d'ébullition . Une partie importante d'oligomères persiste si le temps d'hydrolyse est plus court .

Ce fait mérite d'être noté . En effet l'hydrolyse de ces oligomères est obtenue généralement par un chauffage à 100° de 5 minutes (GRAMSHAW 25) . Il est tout à fait remarquable que, en ce qui concerne les oligomères de pépins de raisins, on soit amené à prolonger ce chauffage pendant 30 minutes . Ces produits sont donc particulièrement stables .

Après hydrolyse deux méthodes peuvent être employées :

- Evaporation à sec sous pression réduite de la solution acide et récupération du résidu par 0, 5 ml de méthanol qui sera entièrement déposé sur la ligne de départ du chromatogramme .

- Extraction des catéchines libérées par 16 ml d'acétate d'éthyle, que l'on recueille sur sulfate de sodium déshydraté , puis que l'on concentre sous pression réduite .

Ce procédé employé par ITO et coll. (35), permet d'éliminer une grande partie des polymères formés au cours du chauffage et d'obtenir ainsi des chromatogrammes nettement plus lisibles .

L'examen des chromatographies ainsi obtenues (fig. 5) nous permet de conclure que :

1- La tache décelée avant hydrolyse (Rf 0, 37 et 0, 40- voir fig. 4) a pratiquement disparu .

2- On note la présence en quantité notable d'une tache permettant les réactions de coloration et dont le comportement chromatographique est identique à celui de la (+)-catéchine .

3- On note également la présence, quoiqu'en quantité moindre, de la (-)- épicatéchine .

La configuration des figures 4 et 5, schématisant le comportement chromatographique de la fraction isolée avant et après hydrolyse , nous semble décisive pour affirmer la présence des catéchines liées dans les anthocyanogènes peu condensés extraits du pépin et de l'épicarpe de raisin .

Action de l'acide chlorhydrique plus concentré

Puisque par hydrolyse ménagée il n'est pas possible de caractériser la partie leucoanthocyanique, on a recours à une caractérisation indirecte par sa transformation en anthocyanidol .

On peut opérer, soit sur une fraction du précipité des anthocyanogènes oligomères, soit sur la solution aqueuse restant après extraction des catéchines dans l'essai précédent . Cette deuxième méthode présente l'avantage de permettre l'hydrolyse ménagée et la caractérisation de l'anthocyanidol sur la même prise d'essai .

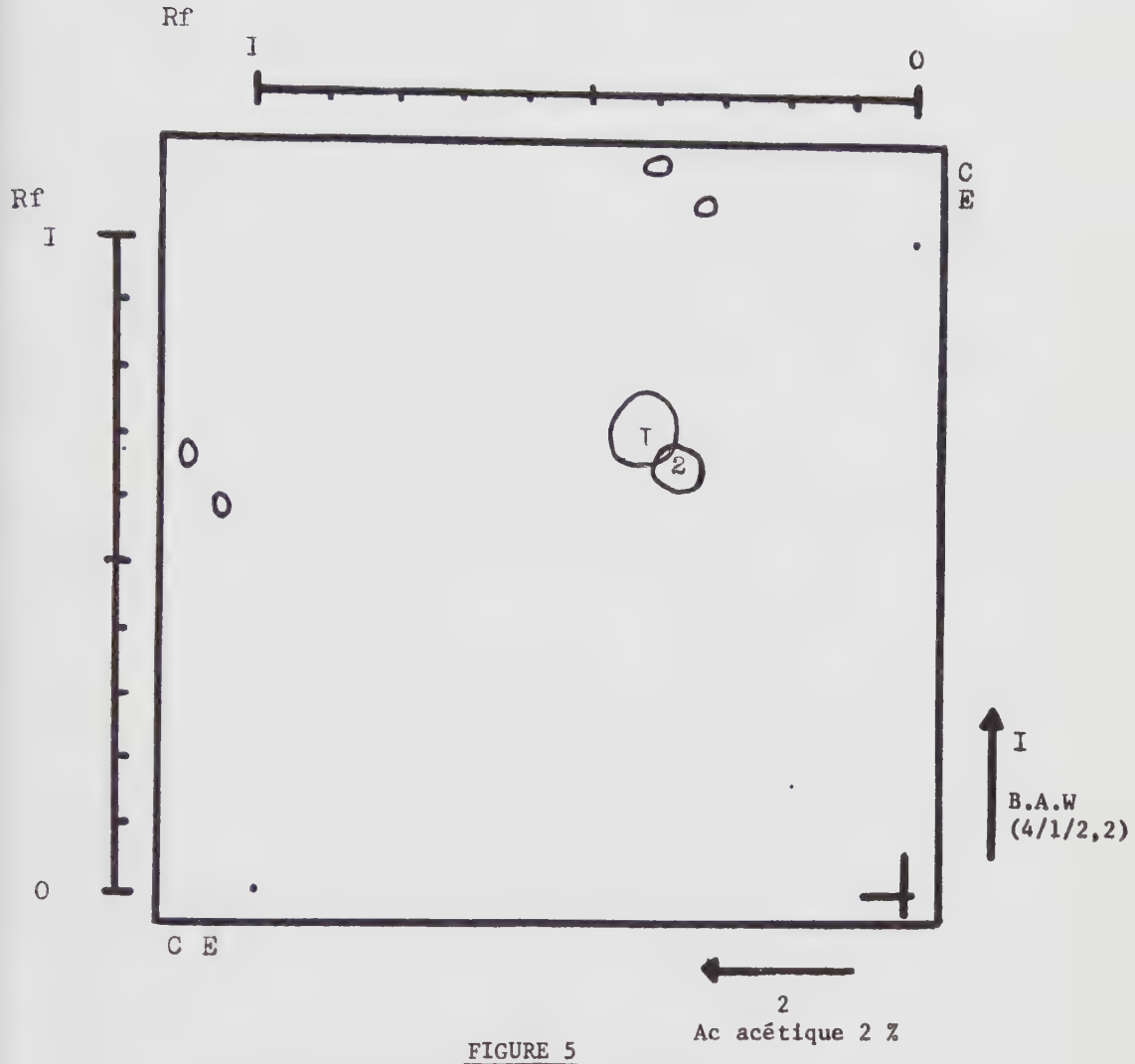


FIGURE 5

SCHEMA DE CHROMATOGRAPHIE BIDIMENSIONNELLE SUR PAPIER DES RESULTATS DE L'HYDROLYSE MENAGEE PRATIQUEE SUR LA FRACTION LEUCOANTHOCYANIQUE OLIGOMERE EXTRAITE DU PEPIN DE RAISIN

1. Catéchine
2. Epicatéchine

C : Témoin (+)-catéchine
E : Témoin (-)-épicatéchine

On apporte de l'acide chlorhydrique à la solution aqueuse, débarrassée de l'acétate d'éthyle par évaporation au bain-marie bouillant . On l'amène ainsi à une normalité de 2 N . Après vingt minutes de chauffage au bain-marie à 100°, la coloration due anx anthocyanidols apparaît . Elle est alors extraite de la solution aqueuse refroidie par le minimum d'alcool isoamylique . Le pigment est ensuite chromatographié en présence de témoin dans le solvant de FORESTAL .

Dans toutes les fractions anthocyanogènes que nous avons extraites du pépin de raisin nous avons toujours caractérisé le cyanidol comme anthocyanidol libéré par dégradation acide .

Extrait éthéré .

La fraction éthérée, obtenue par extraction des graines pendant 48 heures avec de l'éther, est concentrée sous pression réduite, puis chromatographiée sur papier dans le solvant B. A. W. (4/1/2, 2) . Au moyen de taches témoins et puis des colorations obtenues avec le perchlorure de fer comme révélateur il est possible de reconnaître la présence de (+)-catéchine, de (-)-épicatéchine et de gallocatéchine (Rf respectifs de 0, 63 , 0, 61 et 0, 54) .

. . . . .

FIGURE 6

	Silice H. B.Z.A. (10/10/1)	*Arches 304* *B.A.W. (4/1/2,2)*	*B.A.W. (6/1/2,2*	*Whatmann 3 MM* *1ère dimen. B.A.W. (4/1/2,2)*	*2ème dimen. CH_3COOH 2 %*	*Hydrolyse Hcl ménagée*	*Action d'Hcl à chaud*
Leucocyanidol	0,70		0,60		0,43		
Catéchine	0,69		0,64	0,63	0,37		
Epicatéchine	0,64		0,54	0,56	0,30		
Dimère cat/Leuco CA	0,28	0,45 et 0,30	0,35 et 0,25			Catéchine	Cyanidol
CB	0,13					Catéchine	Cyanidol
Epicat/Leuco EA	0,28	0,45 et 0,30	0,35 et 0,25			Epicatéchine	Cyanidol
EB	0,13					Epicatéchine	Cyanidol
				1 *2*	*1* *2*		
Pépins	0,12 & 0,27	de 0,35 à 0,45	de 0,25 à 0,36	de 0,33 à 0,46 0,62 0,56	de 0,37 à 0,30 0,37 0,30	Catéchine Epicatéchine	Cyanidol
Epicarpes			0,34	-	-	Catéchine Epicatéchine	Cyanidol

1 : Avant hydrolyse ménagée - 2 : Après hydrolyse ménagée

REFERENCES CHROMATOGRAPHIQUES DES FLAVANES ET DES OLIGOMERES LEUCOANTHOCYANIQUES DES PEPINS ET DES EPICARPES

5°- Discussion

L'examen de nos résultats (figure 6), nous permet de confirmer la présence dans le pépin et l'épicarpe de raisin d'anthocyanogènes peu condensés dont la partie principale se comporte chromatographiquement comme les dimères préparés par synthèse à partir des catéchines .

Il est difficile avec les méthodes que nous avons utilisées de préciser davantage . Il est à peu près certain que le leucocyanidol de synthèse possède une configuration racémique différente de celle des produits naturels (GRAMSHAW 26) et il n'est pas possible de différencier sur de tels chromatogrammes les divers stéréoisomères .

De plus la faible quantité de produit obtenu ne permet pas de déterminer la proportion réciproque de leucocyanidol et de catéchines : il y a donc un doute sur le degré de condensation . La position sur les chromatogrammes fait pencher en faveur du dimère . Toutefois la condensation en trimère ne doit pas être exclue . Pour cette raison nous nous en tiendrons à la dénomination d'anthocyanogènes oligomères .

C - ISOLEMENT DES ANTHOCYANOGENES OLIGOMERES DES MOUTS .

1°- Principe .

Il serait particulièrement intéressant de connaître la biogénèse de ces anthocyanogènes dans le raisin, puis de suivre leur évolution au cours de la maturation , afin d'étudier leur extraction au cours de la cuvaison par le moût en fermentation . Une aussi vaste recherche sortirait du cadre que nous nous sommes fixé . Toutefois, il nous a paru utile d'ébaucher une étude du passage de ces

produits dans la vendange pendant la macération des grappes dans le jus de raisin . Pour cela il était nécessaire de modifier la technique de JOSLYN, décrite plus haut, pour l'adapter à une prise d'essai liquide .

Dans ce but nous avons utilisé la méthode d'extraction des leucoanthocyanes mise au point par MASQUELIER et coll. (57) . Elle consiste essentiellement à épuiser le vin par de l'éther éthylique pour éliminer les catéchines ; puis, après avoir chassé l'éther sous pression réduite, à extraire les polyphénols par de l'acétate d'éthyle . On se trouve alors en présence d'une solution dans l'acétate d'éthyle que l'on précipitera par l'hexane comme plus haut .

Les essais ont été pratiqués sur des moûts provenant des mêmes raisins rouges qui nous ont servi à la caractérisation des fractions oligomères des graines. Les moûts que nous avons étudiés provenaient en effet du mélange des cépages suivants : Cabernet - Sauvignon , Grand noir de la Calmette, Seibel 5455 . La durée de cuvaison , relativement longue, s'est étendue sur une période de quatorze jours . Trois prélèvements ont été effectués :

- Le soir de la première journée de cuvaison
- Le septième jour
- Le quatorzième jour .

En fait le dernier prélèvement correspond à un vin presque totalement élaboré .

2°- Partie expérimentale .

Les moûts ont été aussitôt filtrés pour avoir des solutions limpides . On a ajouté 25 % (v/v) d'éthanol à 95°/96°. On obtient ainsi un arrêt de la fermentation

et une bonne conservation . Ces liquides sont placés au réfrigérateur à + 4° en attendant l'analyse .

On commence par chasser l'alcool par évaporation sous pression réduite et 50 ml de liquide ainsi privés d'alcool sont épuisés pendant sept heures par l' éther dans un extracteur de HAGEN. La phase aqueuse privée d'éther par agitation sous pression réduite, est extraite, à six reprises, par chaque fois 25 ml d'acétate d'éthyle. Le solvant est recueilli sur sulfate de sodium déshydraté, filtré et concentré sous pression réduite à 25 ml . Cet extrait est alors traité exactement comme nous l' avons fait déjà plus haut (chapitre 4, B fig. 1), pour les pépins et les épicarpes, par précipitation fractionnée à l'hexane. Le mode opératoire est résumé dans la figure 7 .

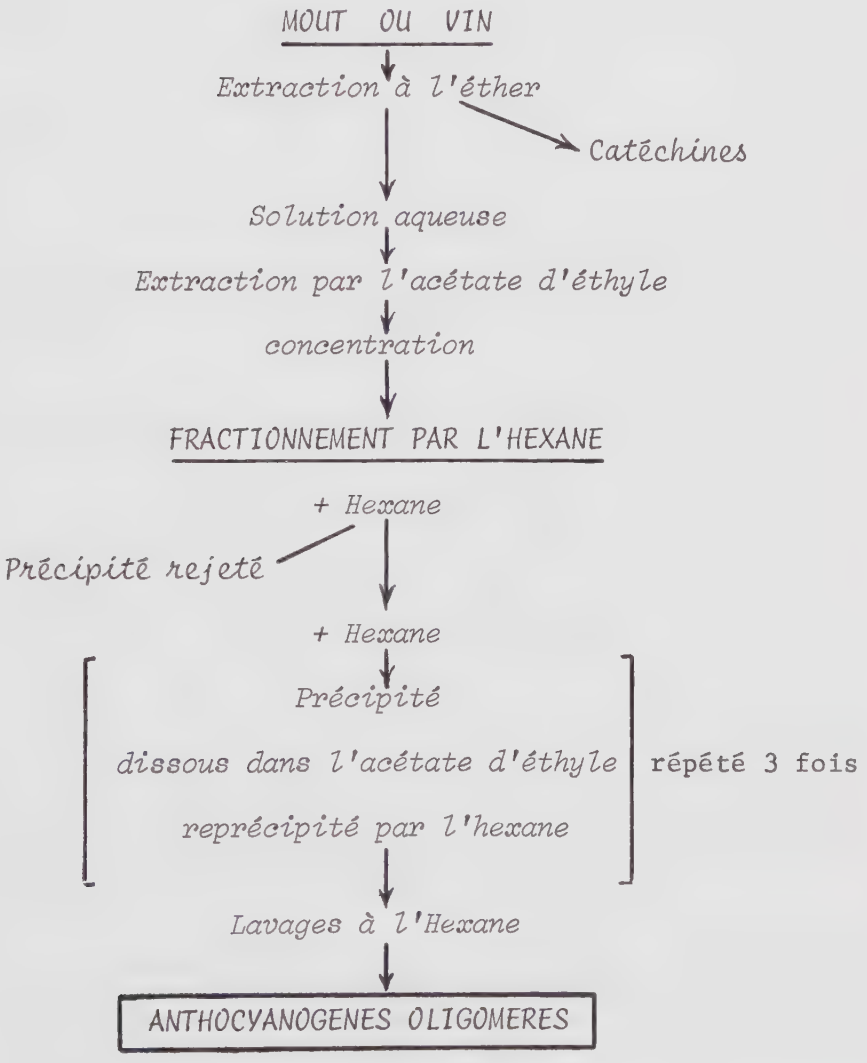
Le précipité qui en résulte est étudié ensuite avec les mêmes méthodes chromatographiques avant hydrolyse, chromatographie après hydrolyse ménagée , transformation en anthocyanidol . Nous renvoyons au chapitre IV, B 3 et 4 pour la description des techniques .

(voir figure 7 page suivante)

Figure 7

TRAITEMENT DES MOUTS ET DES VINS

ADAPTATION DE LA METHODE DE JOSLYN (37)



3°- Résultats .

Le moût du premier jour ne contient pas les anthocyanogènes oligomères que nous avons isolés des pépins et des pellicules . Les zones des chromatographies où cette fraction devrait se trouver localisée ne révèlent aucune trace de ces produits .

En revanche au septième jour le moût fournit les mêmes taches caractéristiques décrites plus haut . De même le vin nouveau du quatorzième jour .

En chromatographie unidimensionnelle avec le solvant B. A. W. (4/1/2, 2) la tache s'étend des Rf 0, 37 à 0, 48 (pour les pépins et les épicarpes nous avions trouvé 0, 36 à 0, 45) voir les tableaux de comparaison 7-8 .

En chromatographie sur couche mince de silice H, on note également les mêmes taches aux Rf 0, 13 et 0, 28 .

Toutefois il est peut-être intéressant de noter que, en ce qui concerne le moût de sept jours, ces taches ont des intensités qui, évaluées visuellement, sont sensiblement égales . Pour le vin nouveau la tache de Rf 0, 13 est importante alors que l'on constate une nette diminution de la tache de Rf 0, 28 .

Par hydrolyse ménagée des anthocyanogènes isolés des moûts de sept et de quatorze jours, les résultats sont identiques à ceux déjà obtenus avec les graines et les épicarpes . Après trente minutes d'hydrolyse au bain-marie en milieu chlorhydrique 0, 1 N, on note la présence de (+)-catéchine et de (-)-épicatéchine .

Après action de l'acide chlorhydrique plus concentré, au bain-marie, les produits isolés donnent un pigment rouge qui, chromatographié avec du cyanidol témoin dans le solvant de FORESTAL, a le même Rf : 0, 50.

4°- Discussion

L'absence d'anthocyanogènes oligomères dans le moût du premier jour confirme bien que ces produits sont extraits des parties ligneuses de la grappe au cours de la fermentation . Il est vraisemblable que l'extraction commence dès le premier jour, mais notre expérimentation réduite nous permet seulement d'affirmer que le passage dans le moût est effectif au septième jour .

Le processus d'extraction peut être plus complexe que l'on pouvait le croire au premier abord . Il semble qu'il y ait non seulement extraction des anthocyanogènes mais aussi transformation partielle puisque nous avons noté la diminution relative d'une des taches entre le septième et le quatorzième jour de cuvaison .

D - CARACTERISATION DES ANTHOCYANOGENES OLIGOMERES DANS LES VINS ROUGES .

1°- Principe

Les substances anthocyanogènes que nous avons décelées dans les parties ligneuses du raisin et que nous avons vu passer dans le moût au cours de la fermentation se trouvent donc dans le vin nouveau . Il nous faut maintenant suivre leur évolution dans le vin pendant son vieillissement . Pour cela nous avons appliqué les méthodes déjà mises au point à des vins de diverses provenances et d'âges différents .

Nous avons d'abord analysé un vin de l'année, celui-là même qui provenait des moûts que nous avons étudiés antérieurement (figure 8, n°1) .

Nous avons ensuite examiné des vins provenant de crus du Haut-Médoc (n°2) et des premières Côtes de Bordeaux (n°3) ainsi que des vins du Médoc et de la région de Saint-Emilion , de millésimes divers dont l'un âgé de 22 ans .

2°- Résultats

L'examen chromatographique, que ce soit sur papier en première ou en deuxième dimension ou en couche mince, a montré que tous les vins examinés contiennent les mêmes taches que nous avions reconnues dans les pépins et les épicarpes comme des anthocyanogènes oligomères.

On constate comme plus haut que les produits isolés ne contiennent pas de catéchines .

En chromatographie monodimensionnelle sur papier Arches 304 avec comme solvant le B. A. W. (4/1/2, 2) on obtient une seule tache assez étendue . Nous avons vu en effet que ce solvant avait une sélectivité faible .

En revanche, en chromatographie en couche mince, deux taches nettes, dont les Rf 0, 13 et 0, 27 sont les mêmes que ceux des dimères leucoanthocyanes-catéchines .

Après hydrolyse ménagée tous ces produits ont fourni de la catéchine .

Par action de l'acide chlorhydrique plus concentré il y a toujours formation de cyanidol .

On doit noter cependant, en ce qui concerne ce dernier point, que la détermination du pigment anthocyanique provenant de l'anthocyanogène, s'est révélée plus délicate dans les vins jeunes que dans les vins âgés . La présence d'anthocyanes entraînés au cours de la précipitation fractionnée, même en très faibles quantités, provoque l'apparition d'une tache correspondant au malvidol sur les chromatogrammes dans le solvant de FORESTAL. Cependant

FIGURE 8

	Silice H. B.Z.A. (10/10/1)	Arches 304 B.A.W. (4/1/2,2)	Bidimensionnelle après hydrolyse Whatmann 3 MM I.B.A.W.2.CH_3COOH 2 % (4/1/2,2)	Hydrolyse Hcl ménagée	Action de Hcl à chaud
Dimères Catéchiques de synthèse CA	0,28	0,45 et 0,30		Catéchine	Cyanidol
CB	0,13			Catéchine	Cyanidol
EA	0,28	0,45 et 0,30		Epicatéchine	Cyanidol
EB	0,13			Epicatéchine	Cyanidol
VIN N° 1 1968	0,12 & 0,27	de 0,45 à 0,50	0,63 0,37 0,56 0,30	Catéchine Epicatéchine	Cyanidol
VIN N° 2 1947	0,13 & 0,27	de 0,43 à 0,50	0,63 0,37 0,56 0,30	Catéchine Epicatéchine	Cyanidol
N° 2 1951	0,13 & 0,28	de 0,40 à 0,49	0,63 0,37 0,56 0,30	Catéchine Epicatéchine	Cyanidol
N° 2 1954		de 0,43 à 0,50	0,63 0,37 0,56 0,30	Catéchine Epicatéchine	Cyanidol
N° 2 1957		de 0,42 à 0,49	0,63 0,37 0,56 0,30	Catéchine Epicatéchine	Cyanidol
N° 2 1958		de 0,43 à 0,50	0,63 0,37 0,56 0,30	Catéchine Epicatéchine	Cyanidol
N° 2 1960	0,13 & 0,27	de 0,43 à 0,50	0,63 0,37 0,56 0,30	Catéchine Epicatéchine	Cyanidol
VIN N° 3 1960	0,13 & 0,27	de 0,36 à 0,47	0,63 0,37 0,56 0,30	Catéchine Epicatéchine	Cyanidol
N° 3 1961		de 0,36 à 0,50	0,63 0,37 0,56 0,30	Catéchine Epicatéchine	Cyanidol
N° 3 1964		de 0,36 à 0,50	0,63 0,37 0,56 0,30	Catéchine Epicatéchine	Cyanidol

REFERENCES CHROMATOGRAPHIQUES D'OLIGOMERES LEUCOANTHOCYANIQUES DE QUELQUES VINS

il ne semble pas qu'il provienne du leucoanthocyane correspondant mais bien d'un entraînement d'anthocyanes au cours de l'isolement . En effet, pour les vins jeunes la sosolution de la fraction leucoanthocyanique avant hydrolyse est nettement rose . Dans les vins vieux, où la teneur en anthocyanes a fortement diminué, seul le cyanidol est présent après hydrolyse .

3° - Discussion

A la lumière de ces résultats, il nous semble donc possible d'affirmer la présence d'anthocyanogènes peu condensés et qui semblent particulièrement stables puisqu'on les retrouve dans des vins âgés de 22 ans .

Nous avons discuté déjà plus haut du degré de condensation de ces substances . D'après leur comportement chromatographique il ne peut s'agir que de dimères ou de trimères .

Le fait que leur poids moléculaire soit peu élevé, semble les désigner comme les véritables responsables de l'activité vitaminique P du vin .

CONCLUSIONS GENERALES

°°°

Nous avons entrepris ce travail pour essayer de mieux connaître la nature des leucoanthocyanes du vin et en particulier pour essayer de mettre en évidence la forme peu polymérisée et cependant stable dont la présence devient une nécessité pour comprendre l'activité vitaminique P du vin .

Nous pouvons résumer notre recherche en deux interrogations :

a) Le leucocyanidol monomère existe-t-il dans le vin ?

b) Si la forme monomère du leucocyanidol est absente du vin, comment peut-il conserver longtemps son activité vitaminique P, pourtant liée aux formes peu condensées ?

Nos travaux nous ont conduit aux conclusions suivantes :

1°- Nous n'avons pu mettre en évidence dans le vin rouge la forme monomère du leucocyanidol à des concentrations compatibles avec son activité biologique .

2°- Nous avons caractérisé dans ces vins une fraction leucoanthocyanique oligomère identique à celle du pépin de raisin blanc et rouge et de l'épicarpe de raisin

blanc dont le comportement chromatographique est analogue à celui des dimères leucocyanidol -catéchine obtenus par synthèse .

3°- Par hydrolyse ménagée, ces fractions leucoanthocyaniques fournissent de la (+)-catéchine et de la (-)-épicatéchine .

4°- Par action de l'acide chlorhydrique à 100° ces mêmes fractions donnent du cyanidol, ce qui permet de conclure à la présence du leucocyanidol dans la fraction oligomère primitive .

5°- Cette fraction apparaît au cours de la vinification, lorsque les épicarpes et les pépins sont au contact du moût .

6°- Nous avons pu mettre en évidence cette fraction leucocyanidol-catéchine dans tous les vins rouges examinés, même ceux ayant 22 ans d'âge .

Nous estimons donc avoir répondu aux questions posées . La mise en évidence de cette fraction oligomère leucoanthocyanique, qui semble la forme stable quoique peu condensée, donc physiologiquement active, du leucocyanidol dans le vin rouge , nous paraît apporter une contribution intéressante à la connaissance des propriétés biologiques du vin .

B I B L I O G R A P H I E

1 - BATE-SMITH E.C.-
Colour reactions of flowers attributed to Flavanols and carotenoid oxides.
J. Exper. Bot., 1953, 4, 1 - 9.

2 - BATE-SMITH E.C., SWAIN,T.-
Identification of leuco-anthocyanins as tannins in food.
Chem. and Ind., 1953, 377-378.

3 - BATE-SMITH E.C. -
Astringency in food .
Food, 1954, 23, 124.

4 - BATE-SMITH E.C., METCALFE C.R. -
Leucoanthocyanins - 3 - The nature and systematic distribution of tannins in the dicotyledons plants.
J. Linn. Soc. London.Botany, 1957, 55, 669-705.

5 - BATE-SMITH E.C., RIBEREAU-GAYON P. -
Leucoanthocyanins in seeds.
Qualitas plantarum et Materiae vegetabiles., 1959, 51, 3, 189 - 198.

6 - CANTARELLI C. -
La stabilisation des vins vis à vis de la maderisation par élimination des leucoanthocyannes..
Ann. Technol. Agric. (Fr).,1964, 12, hors série 1, 260 - 261.

7 - CANTARELLI C. -
Etude de la madérisation et de la prévention dans les vins blancs.
II Symp. Inter. Oenologie, Bordeaux, 1967, INRA. Ed., 1968, Vol. 2, 391 - 407.

8 - CANTARELLI C., PERI C. -
The leucoanthocyanins in white grapes : Their distribution, amount, and fate during fermentation.
Am. J. Enol. Vitic., 1964, 15, 146 - 153.

9 - CHANDLER B.V., SWAIN T. -
Separation of anthocyanins from plant extracts.
Nature, 1959, 183, 989.

10 - CLAVEAU P. -
Recherches biochimiques et pharmacologiques sur le leucocyanidol de la Pruche.
Thèse doct. Pharmacie Université, Bordeaux, 1964.

11 - CREASY L.L., SWAIN T. -
Structure of condensed tannins.
Nature, 1965, 208, 151 - 153.

12 - CREASY L.L., SWAIN T. -
Flavan production in Strawberry leaves.
Phytochem, 1966, 5, 501 - 509.

13 - DAINCIART A. -
Contribution à l'étude de la nature et de l'évolution des acides phénols et des leucoanthocyannes de la vigne.
Thèse doct. Pharmacie (Etat), Bordeaux, 1967.

14 - FORSYTH W.G.C. -
Leucocyanidin and epicatechin.
Nature, 1953, 172, 726 - 727.

15 - FORSYTH W.G.C., ROBERTS J.B. -
Cacao "leucocyanidin".
Chem. and Ind., 1958, 755.

16 - FORSYTH W.G.C., ROBERTS J.B. -
Cacao polyphenolic subtances.
5- The structure of Cacao leucocyanidin.
Biochem. J., 1960, 74, 374 - 378.

17 - FREUDENBERG K., MAITLAND P. -
Der Quebracho-Gerbstoff.
Lieb. Ann.,1934, 510, 193 - 205.

18 - FREUDENBERG K., WEINGES. -
Catechine, andere hydroxy-flavane and hydroxy-flavene.
Fortsch. chem. org. Naturstoffe., 1958, 16, 1.

19 - FREUDENBERG K., WEINGES K. -
Catechins and flavonoid tannins.
In "the chemistry of flavonoid compounds"
Geissman, T.A. Edit. Pergamon Press. Oxford,
1962, 197 - 216.

20 - FULLER W.L., BERG H.W. -
Treatmeant of white wine with nylon 66.
Amer. J. Enol. Viticult., 1965, 12, 4, 212 - 218.

21 - GEISSMAN T.A., DITTMAR H.F.K. -
A proanthocyanidin from Avocado seed.
Phytochem.,1965, 4, 359 - 368.

22 - GOLDSTEIN J.C., SWAIN T. -
Changes in tannins in ripening fruit.
Phytochem., 1963, 2, 371 - 383.

23 - GOVINDARAJAN V.S., MATHEW A.G. -
Polyphenolic substances of Arecanut - 1 - chromatographic analysis of fresh mature nut.
Phytochem., 1963, 2, 321 - 326.

24 - GOVINDARAJAN V.S., MATHEW A.G. -
Authocyanidins from leucoanthocyanidins.
Phytochem.,1965, 4, 985 - 986.

25 - GRAMSHANW J.W. -
Phenolic constituents of Beer and Brewing materials - II - The role of polyphenols in the formation of non biological haze.
J. Inst. Brew., 1967, 73, 455-472.

26 - GRAMSHAW J.W. -
Phenolic constituents of Beer and Brewing materials - III - Simple anthocyanogens from berr.
J. Inst. Brew., 1968, 74, 20-38.

27 - GRENIER D. -
Leucocyanidol et croissance végétale.
Thèse doct. Pharmacie (Etat), Bordeaux, 1968.

28 - HATWAY D.E. -
Oak bark tannins.
Biochem. J., 1958, 70, 34-42.

29 - HATWAY D.E. -
The condensed tannins. In "Wood Extractives".
Hillis, W.E., Ed. Academic Press London, 1962.

30 - HATWAY D.E., SEAKINS J.W.T. -
Auto-oxydation of polyphenols - Part. III - Auto-oxydation in neutral aqueous solution of flavans related to catechin.
J. Chem. Soc., 1957, 4, 1562-1566.

31 - HATWAY D.E., SEAKINS J.W.T. -
Enzymic oxydation of Catechin to a polymer Structurally related to some Phlobotannins.
Biochem. J., 1957, 67, 239-245.

32 - HILLIS W.E., SWAIN T. -
Influence of illumination of the synthesis of leucoanthocyanins in leaves.
Nature, 1957, 179, 586-587.

33 - HILLIS W.E., URBACH G.J. -
Leucoanthocyanins as possible precursors of tannins.
Nature, 1959, 182, 657-658.

34 - ITO J., JOSLYN M.A. -
Presence of several phenolic components in fruit proantocyanidins.
Nature, 1964, 204, 475 - 476.

35 - ITO J., JOSLYN M.A. -
Apple leucoanthocyanins.
J. Food. Sci. U.S.A., 1965, 30, 1, 44 - 51.

36 - JOSLYN M.A., GOLDSTEIN J.L. -
Conversion of leucoanthocyanins into the corresponding anthocyanidins.
Science, 1964, 143, 954 - 955.

37 - JOSLYN M.A., DITTMAR H.F.K. -
The proanthocyanidins of Pinot blanc grapes.
Amer. J. Enol. Viticult., 1967, 18, 1, 1 - 10.

38 - JURD L. -
Spectral properties of flavonoid compounds.
In "Chemistry of flavonoid compounds".
Geissman, T.A., Edit. Pergamon Press, Oxford,1962.

39 - KING F.E., BOTTOMLEY W. -
The chemistry of extractives from Hardwood - part XXII.
J. Chem. Soc., 1954, 1399 - 1404.

40 - KING F.E., CLARK-LEWIS J.W. -
The constitution and synthesis of leucoanthocyanidins.
J. Chem. Soc., 1955, 3384.

41 - LAUMAS K.R., SESHADRI T.R., -
Leucocyanidins from Tamarind seed testa.
J. sci. Industr. Res., 1958, 178, 1, 44 - 55.

42 - LAURENT S. -
Complément à l'étude chromatographique du contenu phénolique des prothalles de Filicinées.
Rev. Gen. Bot., 1962, 69, 407 - 408.

43 - LEWAK S. -
Leucocyanidins of the leaves of Hawthorn.
Roczniki. Chem. Pol., 1964, 38, 1773 - 1780.

44 - LEWAK S. -
Determination of the degree of polymerisation of leucoanthocyanidins.
Phytochem., 1968, 7, 665 - 667.

45 - LEWAK S., DZIEWANOWSKA K. -
Oligomeric leucoanthocyanidin of Hawthorn.
Roczniki. Chem. Pol., 1966, 40, 2025 - 2026.

46 - MAC FARLANE W.D. -
Determination of anthocyanogens.
J. Inst. Brew., 1961, 67, 502 - 507.

47 - MARECA - CORTES I. -
Dissolution et évolution de la couleur dans les vins rouges.
II Symp. Inter. Oenologie, Bordeaux, 1967, INRA. Ed., 1968, Vol. 1, 289 - 305.

48 - MASQUELIER J. -
Etude chimique sur les pigments de la graine d'Arachide. Le Tannoïde et le Phlobaphène.
Bull. Soc. Chim. Fr., 1948, 15, 1175 - 1177.

49 - MASQUELIER J. -
Sur quelques propriétés biologiques des Anthocyanes et des leucoanthocyanes de la vigne.
Qualitas plantarum et Materiae vegetabiles., 1958, 3/4, 481 - 490.

50 - MASQUELIER J. -
The bacterial action of certain phenolics of grape and wine.
In "The pharmacology of plant phenolics".
Academie Press, London, 1958.

51 - MASQUELIER J. -
Dosage des leucoanthocyannes du vin blanc. Emploi de la poudre de polyamide.
Bull. Soc. Pharm., Bordeaux, 1963, 102, 51-52.

52 - MASQUELIER J. -
"Traite d'Oenologie", RIBEREAU-GAYON J., PEYNAUD E.
Dunod, Paris, 1966, 2ème Edit., Tome 2.

53 - MASQUELIER J. -
Les Antibiotiques naturels des Aliments.
"Antibiotiques en Agriculture". C.R. 5e coll. Group. Europ. Nutr. Jouy-en-Jossas, 1966.
In "Nutritio et Dieta".
Karger, Edit., Basel/New-York, 1968, 10, 159 - 175.

54 - MASQUELIER J., GOLSE J. -
Présence du complexe leucocyanidol-catéchine de FORSYTH dans le chocolat.
Bull. Soc. Pharm.,Bordeaux, 1961, 100, 241-247.

55 - MASQUELIER J., JENSEN H. -
Recherches sur l'Action Vitaminique P du vin.
Bull. Soc. Pharm.,Bordeaux, 1953, 91, 20 - 23.

56 - MASQUELIER J., JENSEN H. -
Recherches sur l'Activité bactéricide des vins rouges.
Bull. Soc. Pharm.,Bordeaux, 1953, 91, 24 - 29.

57 - MASQUELIER J., MICHAUD J., TRIAUD J. -
Fractionnement des leucoanthocyannes du vin.
Bull. Soc. Pharm.,Bordeaux, 1965, 104, 81 - 85.

58 - MASQUELIER J., PATAY R., DANNON G., BERNARD J.P., -
A propos de l'Action d'un Tannoïde du vin.
Bull. Acad. Nat. Médecine, 1960, 144, 716 - 718.

59 - MASQUELIER J., POINT G. -
Les leucoanthocyannes des Cepages Blancs de Vitis Vinifera.
Bull. Soc. Pharm.,Bordeaux, 1956, 95, 6 - 11.

60 - MASQUELIER J., VITTE G., ORTEGA M. -
Dosage colorimétrique des leucoanthocyannes dans les Vins rouges.
Bull. Soc. Pharm.,Bordeaux, 1959, 98, 145 - 148.

61 - MATHEW A.G., GOVINDARAJAN V.S. -
Polyphenolic Substances of Arecanut.
II. Changes during maturation and ripening.
Phytochem.,1964, 3, 657 - 665.

62 - MICHALUK A. -
Chromatography of leucoanthocyanidins in Aesculus Hippo-castanum L.
Dissert. Pharm. Pologn., 1963, 15, 3, 285-291.

63 - MICHAUD J. -
Dosage colorimétrique des polyphenols réducteurs.
Bull. Soc. Pharm.,Bordeaux, 1966, 105, 219 - 224.

64 - MICHAUD J. -
Densitométrie des Polyphenols réducteurs.
Ann. Pharm. Fr., 1966, 24, 533 - 537.

65 - MICHAUD J. -
Evaluation densitométrique du Taxifoliol dans le leucocyanidol de Synthèse.
Communication Soc. Pharm. Bordeaux.
Séance du 20.11.1968 (sous presse).

66 - MICHAUD J., MASQUELIER J. -
Synthèse du leucocyanidol monomère.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1968, 50, 7/8, 1346-1348.

67 - MONTIES B. -
Nature et propriétés chimiques des principaux polyphenols de la Pomme.
Ann. Physiol. Veg., 1966, 8, (2), 101 -135.

68 - NATCHOMI E., ALUMOT E. -
Tannins and polyphenols in carob-pods (Ceratonia siliqua).
J. Sci. Food. Agric., 1963, 14, 7, 464 - 468.

69 - ORTEGA M. -
Recherches sur les leucoanthocyannes des vins rouges.
Thèse Doct. Pharm. (université), Bordeaux, 1959.

70 - PATAY R., MASQUELIER J., DANNON G., BERNARD J.P. PATAY M. -
A propos de l'action d'un tannoïde du vin (IIème Note).
Bull. Acad. Nat. Médecine, 1961, 145, 322 - 325.

71 - PERI C. -
Osservazioni Sulla degradazioné acida lei leucoantociani.
Agrochimica, 1967, 11, 439 - 450.

72 - PERI C. -
Acid degradation of leucoanthocyanidins.
Amer. J. Enol. Vitic., 1967, 18, 168 - 174.

73 - PERI C. -
Evolution des Polyphenols au cours de la maturation des Raisins blancs.
II Symp. Inter. Oenologie, Bordeaux, 1967.
INRA, ed., 1968, Vol. 1, 47 - 51.

74 - PIGMAN W., ANDERSON E., FISCHER R., BUCHANAN M.A., BROWNING B.L. -
Color precursors in spruce and western hemlock-woods and Inner Barks.
T.A.P.P.I., 1953, 36, 1, 4 - 12.

75 - REWERSKI W., LEWAK S. -
Einige pharmakologische Eigenschaften der aus Weissdorn (Crataegus oxyacantha) isolierten flavan-polymeren.
Arnzneimittel, Forsch, Dtsch., 1967, 17, 4, 490 - 491.

76 - RIBEREAU - GAYON J., PEYNAUD E. -
Ananlyse et contrôle des Vins.
Libr. Polytechn. Beranger, Paris, 1958.

77 - RIBEREAU - GAYON J., PEYNAUD E. -
Traité d'Oenologie.
Dunod, Paris, 1966, 2ème Edit., Tome 2.

78 - RIBEREAU - GAYON P. -
Le leucocyanidol dans les Vins rouges (Ier note).
C.R. Acad. Agric., 1957, 43, 197.

79 - RIBEREAU - GAYON P. -
Le leucocyanidol dans les vins rouges (observations complémentaires).
C.R. Acad. Agric., 1957, 43, 596 - 598.

80 - RIBEREAU - GAYON P. -
Les composés phénoliques du raisin et du vin.
I.N.R.A., Paris, 1964.

81 - RIBEREAU - GAYON P. -
Les composés phenoliques des végétaux.
Dunod. Ed., Paris 1968.

82 - ROBINSON G.M., ROBINSON R. -
A Survey of Anthocyanins. III. Notes of the distribution of leucoanthocyanins.
Biochem. J., 1933, 27, 206-212.

83 - ROUX D.G. -
Some recent advances in the identification of leucoanthocyanins and the chemistry of condensed tannins.
Nature, 1957, 180, 973.

84 - ROUX D. G. -
Methods of fractionation and identification of constituents of condensed tannins.
J. Amer. Leather. Chem. Ass., 1958, 53, 7, 384-393.

85 - ROUX D.G., PAULUS E. -
Condensed Tannins. 7. Isolation of (-)-7, 3',4' - Trihydroxy flavan -3-ol ((-)-Fisétinidol), a naturally occuring catechin from black-wattle Heartwood.
Biochem. J., 1961, 78, 120 - 123.

86 - ROUX D.G., PAULUS E. -
Condensed Tannins. 8 : The isolation and distribution of interrelated Heartwood components of Schinopsis S.P.P.
Biochem. J., 1961, 78, 785 - 789.

87 - ROUX D.G., PAULUS E. -
Condensed Tannins. 12 : Polymeric leucofisétinidin tannins from heartwood of Acacia Mearnsii
Biochem. J., 1962, 82, 320 - 324.

88 - SOMERS T.C. -
Wine Tannins. Isolation of condensed flavonoïd pigments by gel filtration.
Nature, 1966, 209, 368 - 370.

89 - SOMERS T.C. -
Resolution and analysis of total phenolic constituents of grape pigment.
J. Sci. Food. Agric., 1967, 18, 5, 193 - 196.

90 - STOCKER H.R. -
Zur chemie der Flavanoïdgerbstoffe.
Schweiz. Brauer. Rdsch., 1967, 78, 33 - 56.

91 - STONESTREET E. -
Contribution à l'étude des Tanins et de la matière colorante des vins rouges.
Thèse Doct. Oenologie, Bordeaux, 1965.

92 - SWAIN T. -
Leucocyanidin.
Chem. and Ind., 1954, 1144 - 1145.

93 - SWAIN T., HILLIS W.E. -
The phenolic constituents of Prunus Domestica. I. The quantitative analysis of phenolics constituents.
J. Sci. Food. Agric., 1959, 10, 63 - 68.

94 - TAYEAU F., MASQUELIER J., LEFEVRE G. -
Dosage du leucoanthocyanidol de l'Arachide.
Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 1951, 89, 5 - 10.

95 - VAN BUREN J., NEUKOW H. -
Versuche zur isolierungeines proanthocyanidins aus Äpflen.
Mitt. Geb. Lebensmittel. Unsters. Hyg. Schweiz.,
1965, 56, 4, 303 - 307.

96 - VUATAZ L. , BRANDENBERG H. -
Plant phenols. III : Separation of fermented and black tea polyphenols by cellulose column chromatography.
J. Chromatog., 1961, 5, 17 - 31.

97 - WHALLEY W.B. -
The stereochemistry of flavonoïd compounds
In "The chemistry of flavonoïd compounds".
Geissman, T.A., Ed., Pergamon Press, Oxford, 1962.

98 - WOOF J.B. -
Investigations of phenolics components of Brewing materials by gel filtration.
Nature, 1962, 195, 184.

Editions BERGERET - 2,rue Bergeret - Bordeaux - Tél.91.12.59

TABLE DES MATIERES

Pages

I - INTRODUCTION 1

II - GENERALITES SUR LES TANINS 3

A / Propriétés générales 3

1- Définition 3
2- Propriétés chimiques 5
3- Structure 7
4- Autres propriétés 10

B / Les polymères 12

1- Polymérisation oxydative et enzymatique 13
2- Polymérisation catalysée par les acides 15

C / Le leucocyanidol monomère 18

1- Synthèse 18
2- Propriétés 19

D / Les oligomères 20

E / Propriétés physiologiques 22

III - LES TANINS DE LA VIGNE ET DU VIN 24

A / Difficultés d'isolement 24

Pages

B_/ Dosage des tanins dans les vins par formation d'anthocyanidols 26

C_/ Evaluation du degré de polymérisation par l'indice V/LA et V/FD 29

D_/ Fractionnement par les solutions saturées 31

E_/ Travaux de JOSLYN et DITTMAR 32

IV - TRAVAUX PERSONNELS 34

A_/ Recherche du leucocyanidol monomère dans le vin 34

1- Techniques 36
. Polyamide-célite 36
. Polyamide pure 37

2- Résultats et discussion 38

B_/ Isolement des anthocyanogènes oligomères de la baie de raisin 39

1- Principe 40
2- Partie expérimentale 41
. Traitement des épicarpes 41
. Traitement des pépins 42
3- Analyse chromatographique 44
. Méthode 44
. Produits de références 46
. Révélation des taches 48
4- Résultats 50
. Chromatographie avant hydrolyse 50
. Chromatographie après hydrolyse ménagée 52
. Transformation en anthocyanidol 56
. Extrait éthéré 58
5- Discussion 60

Pages

C / Isolement des anthocyanogènes oligomères des moûts 60

1- Principe 60
2- Partie expérimentale 61
3- Résultats 64
4- Discussion 65

D / Caractérisation des anthocyanogènes oligomères dans les vins rouges 65

1- Principe 65
2- Résultats 66
3- Discussion 68

V - CONCLUSIONS GENERALES 69

VI - BIBLIOGRAPHIE 71

EDITIONS BERGERET- 2, rue Bergeret -BORDEAUX. Tél. 91.12.59